

PCT/JP 2004/011291

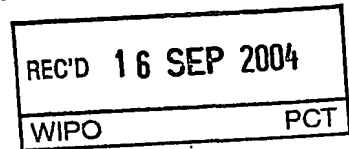
日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

30. 7. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 3 月 2 6 日
Date of Application:



出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 0 9 3 8 7 2
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 9 3 8 7 2]

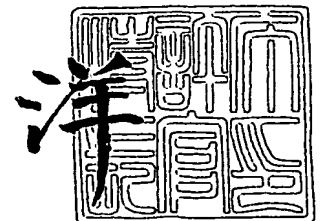
出 願 人 独立行政法人産業技術総合研究所
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 9 月 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 7 8 8 6 1

【書類名】 特許願
【整理番号】 2004001812
【提出日】 平成16年 3月26日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 A61K 9/00
A61K 31/00

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 山寄 登

【発明者】
【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所
つくばセンター内
【氏名】 小島 周二

【特許出願人】
【識別番号】 301021533
【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】
【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】
【識別番号】 100118773
【弁理士】
【氏名又は名称】 藤田 節

【選任した代理人】
【識別番号】 100111741
【弁理士】
【氏名又は名称】 田中 夏夫

【先の出願に基づく優先権主張】
【出願番号】 特願2003-285432
【出願日】 平成15年 8月 1日

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 2】

リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比 0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比 0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される 1 種以上の脂質（モル比 0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される 1 種以上の脂質（モル比 0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比 0～70%）を含む、請求項 1 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 3】

ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも 1 種の脂質がリポソーム表面上で集合しラフトを形成している請求項 2 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 4】

糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 5】

リポソームの平均粒径が 30～500nm である、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 6】

リポソームの平均粒径が 50～350nm である、請求項 5 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 7】

リポソームの平均ゼータ電位が -50～10mV である、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 8】

リポソームの平均ゼータ電位が -40～0mV である、請求項 7 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 9】

リポソームの平均ゼータ電位が -30～-10mV である、請求項 8 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 10】

糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 11】

リンカー蛋白質が生体由来蛋白質である請求項 10 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 12】

リンカー蛋白質がヒト由来蛋白質である請求項 11 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 13】

リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである請求項 11 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 14】

リンカー蛋白質がリポソーム表面上に形成されているガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも 1 種の脂質からなるラフト上に結合している請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 15】

リポソーム膜および／またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 16】

親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式 (1)

X-R1(R2OH)_n 式(1)

で示される請求項 15 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 17】

親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(2)

H₂N-R3-(R4OH)_n 式(2)

で示される請求項 15 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 18】

親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(3)

H₂N-R5(OH)_n 式(3)

で示される請求項 15 記載の糖鎖修飾リポソームであって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 19】

リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にアミノアルコール類を結合させることによりリポソーム膜および/またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 15 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 20】

リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および/またはリンカー蛋白質が親水性化されている、請求項 19 記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 21】

リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム 1 粒子当たり 1~30000 個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム 1 粒子当たり最高 1~500000 個である、請求項 1 から 20 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 22】

リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させる蛋白質 1 分子当たり 1~60 個である、請求項 1 から 21 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 23】

リポソームが腸管吸収機能を有するものである請求項 1 から 22 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 24】

血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織およびリンパ節からなる群から選択される組織または器官に指向性の高い、請求項 1 から 23 のいずれか 1 項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項 25】

糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、ア

ルファ1,6マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および3-フコシルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、請求項1から24のいずれか1項に記載の糖鎖修飾リポソーム。

【請求項26】

請求項1から25のいずれか1項に記載のリポソームに薬剤または遺伝子を封入したりポソーム製剤。

【請求項27】

薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODNやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される請求項26記載のリポソーム製剤。

【請求項28】

経口投与用製剤である、請求項26または27に記載のリポソーム製剤。

【請求項29】

非経口投与用製剤である、請求項26または27に記載のリポソーム製剤。

【請求項30】

薬剤が腫瘍用薬剤である、請求項27記載のリポソーム製剤を含む抗癌剤。

【請求項31】

経口投与用抗癌剤である、請求項30記載の抗癌剤。

【請求項32】

非経口投与用抗癌剤である、請求項30記載の抗癌剤。

【請求項33】

リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジリエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比0～70%）を含む、リポソーム。

【請求項34】

さらに、蛋白質を含む請求項33記載のリポソーム。

【請求項35】

リポソーム膜が低分子の親水性化合物により親水性化されている、請求項33または34に記載のリポソーム。

【請求項36】

低分子の親水性化合物が少なくとも1つのOH基を有する化合物である、請求項35記載のリポソーム。

【請求項37】

親水性化合物が、一般式 (1)

$X-R1(R2OH)_n$ 式 (1)

で示される請求項 35 記載のリポソームであって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム。

【請求項 38】

親水性化合物が、一般式 (2)

$H_2N-R3-(R4OH)_n$ 式 (2)

で示される請求項 35 記載のリポソームであって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム。

【請求項 39】

親水性化合物が、一般式 (3)

$H_2N-R5(OH)_n$ 式 (3)

で示される請求項 35 記載のリポソームであって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム。

【請求項 40】

リポソーム膜にアミノアルコール類を結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、請求項 35 記載のリポソーム。

【請求項 41】

リポソーム膜にトリス (ヒドロキシメチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノエタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノメタン、トリス (ヒドロキシメチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシエチル) アミノプロパン、トリス (ヒドロキシプロピル) アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、請求項 40 記載のリポソーム。

【請求項 42】

請求項 33 から 41 のいずれか 1 項に記載のリポソームに薬剤または遺伝子を封入したリポソーム製剤。

【請求項 43】

薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODNやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される請求項 42 記載のリポソーム製剤。

【請求項 44】

経口投与用製剤である、請求項 42 または 43 に記載のリポソーム製剤。

【請求項 45】

非経口投与用製剤である、請求項 42 または 43 に記載のリポソーム製剤。

【請求項 46】

薬剤が腫瘍用薬剤である、請求項 43 記載のリポソーム製剤を含む抗癌剤。

【請求項 47】

経口投与用抗癌剤である、請求項 46 記載の抗癌剤。

【請求項 48】

非経口投与用抗癌剤である、請求項 46 記載の抗癌剤。

【書類名】明細書

【発明の名称】糖鎖を有する標的指向性および腸管吸収制御性リポソームならびにそれを含む癌治療薬および診断薬

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬品、化粧品をはじめ医学・薬学分野において応用し得る、癌などの標的細胞・組織を認識し局所的に薬剤や遺伝子を患部に送り込むための治療用のドラッグデリバリーシステムや診断用の細胞・組織センシングプローブとして利用できるものであって、特に腸管吸収性に優れた糖鎖修飾リポソーム、およびこれに薬剤あるいは遺伝子等を封入したリポソーム製剤に関する。

【背景技術】

【0002】

米国の国家ナノテク戦略（NNI）によって実現を目指す具体的目標の一例として、「癌細胞や標的組織を狙い撃ちする薬物や遺伝子送達システム（DDS：ドラッグデリバリーシステム）」を掲げた。日本の総合科学技術会議のナノテクノロジー・材料分野推進戦略でも、重点領域として「医療用極小システム・材料、生物のメカニズムを活用し制御するナノバイオロジー」があり、その5年間の研究開発目標の1つとして「健康寿命延伸のための生体機能材料・ピンポイント治療等技術の基本シーズ確立」が掲げられている。一方、高齢化社会となるに伴い癌の発症率・死亡率は年々増えており、新規な治療材料である標的指向DDSの開発が待望されている。その他の病気においても副作用のない標的指向DDSナノ材料の重要性が注目されており、その市場規模は近い将来に10兆円を超えると予測されている。また、これらの材料は治療とともに診断への利用においても期待されている。

【0003】

医薬品の治療効果は、薬物が特定の標的部位に到達し、そこで作用することにより発現される。その一方で、医薬品による副作用とは、薬物が不必要な部位に作用してしまうことである。従って、薬物を有効かつ安全に使用するためにもドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。その中でも特に標的指向（ターゲティング）DDSとは、薬物を「体内の必要な部位に」、「必要な量を」、「必要な時間だけ」送り込むといった概念である。そのための代表的な材料としての微粒子性キャリアーであるリポソームが注目されている。この粒子に標的指向機能をもたせるために、リポソームの脂質の種類、組成比、粒子径、表面電荷を変化させるなどの受動的ターゲティング法が試みられているが、いまだ本法は不十分であり更なる改良が求められている。

【0004】

一方、高機能のターゲティングを可能にするために、能動的ターゲティング法も試みられている。これは“ミサイルドラッグ”ともよばれ理想的なターゲティング法であるが、国内外においていまだ完成されたものはなく今後の発展が大いに期待されているものである。本法は、リポソーム膜面上にリガンドを結合させ、標的組織の細胞膜面上に存在するレセプターに特異的に認識させることによって、積極的にターゲティングを可能にさせる方法である。この能動的ターゲティング法での標的となる細胞膜面上に存在するレセプターのリガンドとしては、抗原、抗体、ペプチド、糖脂質や糖蛋白質などが考えられる。これらのうち、糖脂質や糖蛋白質の糖鎖は、生体組織の発生や形態形成、細胞の増殖や分化、生体防御や受精機構、癌化とその転移機構などの様々な細胞間コミュニケーションにおいて情報分子としての重要な役割を果たしていることが明らかにされつつある。

【0005】

また、その標的となる各組織の細胞膜面上に存在するレセプターとしてのセレクトイン、DC-SIGN、DC-SIGNR、コレクチン、マンノース結合蛋白質等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）についての研究も進んできたことから、各種の分子構造を有する糖鎖は新しい

DDSリガンドとして注目されてきている (1)Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) Adv. Drug Delivery Rev. 43, 225-244. 2)Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。

【0006】

外膜表面にリガンドを結合したリポソームについては、癌などの標的部位に選択的に薬物や遺伝子などを送達するためのDDS材料として多くの研究がなされてきた。しかしながら、それらは、生体外では標的細胞に結合するが、生体内では期待される標的細胞や組織にターゲティングされないものがほとんどである (1)Forssen, E. and Willis, M. (1998) Adv. Drug Delivery Rev. 29, 249-271. 2)高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社、大阪)。糖鎖の分子認識機能を利用したDDS材料の研究開発においても、糖鎖を有する糖脂質を導入したリポソームについて若干の研究が知られているが、それらの機能評価は生体外 (in vitro) によるもののみであり、糖鎖を有する糖蛋白質を導入したリポソームの研究はほとんど進んでいない

(1)DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6101-6104. 2)Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) J. Med. Chem. 39, 1018-1020. 3)Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) Glycobiology 8, 311-319. 4)Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329. <http://www.gak.co.jp/TIGG/71PDF/yamazaki.pdf>)。したがって、糖脂質や糖蛋白質の多種多様な糖鎖を結合したリポソームについての調製法と生体内動態 (in vivo) 解析を含めた体系的な研究は、これまで未開発で今後の進展が期待される重要課題である。

【0007】

さらに新しいタイプのDDS材料研究として、投与が最も簡便・安価に行える経口投与で使用可能なDDS材料開発も重要課題である。たとえば、ペプチド性および蛋白質性医薬品などは一般的に水溶性で高分子量であり消化管の小腸粘膜透過性が低いため酵素分解を受けるなどにより経口投与してもほとんど腸管吸収されない。そこでこれらの高分子量の医薬品や遺伝子などを腸管から血液中へ送達するためのDDS材料としてリガンド結合リポソームの研究が注目されつつある (Lehr, C.-M. (2000) J. Controlled Release 65, 19-29)。しかしながら、これらのリガンドとして糖鎖を用いた腸管吸収制御性リポソームの研究は未だ報告されていない。

【0008】

本発明者等は、既に、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されており、糖鎖が、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖から選ばれたものであり、リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にトリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンが任意に結合しており親水性化されていることを特徴とする糖鎖修飾リポソームおよびラクトース2糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および3-フコシルラクトース三糖鎖から選ばれた糖鎖により修飾されたリポソームであって、糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソームに結合していてもよい、腸管吸収制御性リポソームについて特許出願を行っている。

【0009】

【非特許文献1】Yamazaki, N., Kojima, S., Bovin, N.V., Andre, S., Gabius, S. and Gabius, H.-J. (2000) Adv. Drug Delivery Rev. 43, 225-244.

【非特許文献2】Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329.

【非特許文献3】Forssen, E. and Willis, M. (1998) Adv. Drug Delivery Rev. 29, 249-271.

【非特許文献4】高橋俊雄・橋田充編(1999)、今日のDDS・薬物送達システム、159-167頁、医薬ジャーナル社

【非特許文献5】DeFrees, S.A., Phillips, L., Guo, L. and Zalipsky, S. (1996) J. Am. Chem. Soc. 118, 6101-6104.

【非特許文献6】Spevak, W., Foxall, C., Charych, D.H., Dasgupta, F. and Nagy, J.O. (1996) J. Med. Chem. 39, 1018-1020.

【非特許文献7】Stahn, R., Schafer, H., Kernchen, F. and Schreiber, J. (1998) Glycobiology 8, 311-319.

【非特許文献8】Yamazaki, N., Jigami, Y., Gabius, H.-J., Kojima, S (2001) Trends in Glycoscience and Glycotechnology 13, 319-329.

【非特許文献9】Lehr, C.-M. (2000) J. Controlled Release 65, 19-29

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

本発明は、各種組織の細胞表面上に存在する各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）に対して特異的な結合活性を有する糖鎖を結合したリポソームであって、実際の生体内の細胞、組織を識別して薬剤あるいは遺伝子を効率的に輸送し得るリポソームを提供することを目的とする。さらに、本発明は、該リポソームを含む疾患治療剤の提供をも目的とする。さらに、本発明は安定性の高いリポソームの提供を目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

上記の課題を解決するために、本発明者等は、リポソームの組成について検討を行い、安定性の高いリポソームを得た。さらに、リポソームの表面に結合させる糖鎖の種類および結合密度、リンカー蛋白質、ならびにリポソームを親水化するための化合物等について種々の実験、検討を加え、糖鎖の構造により各組織への指向性を実際に制御できることに加え、リポソーム表面および/またはリンカー蛋白質を特定の親水性化合物により水和処理し、さらにリポソームに結合する糖鎖の密度を制御すれば、各組織に対するリポソームの移行量をさらに増大し得、これにより薬剤あるいは遺伝子を標的細胞、組織に効率的に輸送できることを見だし、本発明を完成するに至ったものである。

【0012】

本発明者らは、さらにこのようにして得られたリポソームを実際に疾患の治療に用いることについて鋭意検討を行い、表面に結合させた糖鎖の種類に応じて種々の組織および器官の種々の疾患に適用できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0013】

すなわち、本発明は、以下の[1]～[50]に係るものである。

[1] 糖鎖がリポソーム膜に結合されている糖鎖修飾リポソーム、

[2] リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比0～70%）を含む、[1]の糖鎖修飾リポソーム、

[3] ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質がリポソーム表面上で集合しラフトを形成している[2]の糖鎖修飾リポソーム、

[4] 糖鎖の種類および密度が制御されて結合されている、[1]から[3]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[5] リポソームの平均粒径が30～500nmである、[1]から[4]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[6] リポソームの平均粒径が50～350nmである、[5]の糖鎖修飾リポソーム、

[7] リポソームの平均ゼータ電位が $-50 \sim -10\text{mV}$ である、[1]から[6]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[8] リポソームの平均ゼータ電位が $-40 \sim 0\text{mV}$ である、[7]の糖鎖修飾リポソーム、

[9] リポソームの平均ゼータ電位が $-30 \sim -10\text{mV}$ である、[8]の糖鎖修飾リポソーム、

[10] 糖鎖がリンカー蛋白質を介してリポソーム膜に結合されている、[1]から[9]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[11] リンカー蛋白質が生体由来蛋白質である[10]の糖鎖修飾リポソーム、

[12] リンカー蛋白質がヒト由来蛋白質である[11]の糖鎖修飾リポソーム、

[13] リンカー蛋白質がヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンである[11]の糖鎖修飾リポソーム、

[14] リンカー蛋白質がリポソーム表面上に形成されているガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質からなるラフト上に結合している[1]から[13]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[15] リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[1]から[14]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[16] 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(1)

X-R1(R2OH)_n 式(1)

で示される[15]の糖鎖修飾リポソームであって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム、

[17] 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(2)

$\text{H}_2\text{N-R3-(R4OH)}_n$ 式(2)

で示される[15]の糖鎖修飾リポソームであって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム、

[18] 親水性化合物により親水性化され、該親水性化合物が、一般式(3)

$\text{H}_2\text{N-R5(OH)}_n$ 式(3)

で示される[15]の糖鎖修飾リポソームであって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、 H_2N はリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、糖鎖修飾リポソーム、

[19] リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にアミノアルコール類を結合させることによりリポソーム膜および/またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[15]の糖鎖修飾リポソーム、

[20] リポソーム膜および/またはリンカー蛋白質にトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜および/またはリンカー蛋白質が親水性化されている、[19]の糖鎖修飾リポソーム、

[21] リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リンカー蛋白質を用いる場合は、リポソーム1粒子当たり1~30000個であり、リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1~500000個である、[1]から[20]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[22] リポソームに結合した糖鎖の結合密度が、リポソームに結合させる蛋白質1分子当たり1~60個である、[1]から[21]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[23] リポソームが腸管吸収機能を有するものである[1]から[22]のいずれかの糖鎖

修飾リポソーム、

[24] 血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織およびリンパ節からなる群から選択される組織または器官に指向性の高い、[1]から[23]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[25] 糖鎖がリポソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ1,2マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および3-フコシルラクトース三糖鎖からなる群から選択される、[1]から[24]のいずれかの糖鎖修飾リポソーム、

[26] [1]から[25]のいずれかのリポソームに薬剤または遺伝子を封入したリポソーム製剤、

[27] 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODNやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される[26]のリポソーム製剤、

[28] 経口投与用製剤である、[26]または[27]のリポソーム製剤、

[29] 非経口投与用製剤である、[26]または[27]のリポソーム製剤、

[30] 薬剤が腫瘍用薬剤である、[27]のリポソーム製剤を含む抗癌剤、

[31] 経口投与用抗癌剤である、[30]の抗癌剤、

[32] 非経口投与用抗癌剤である、[30]の抗癌剤、

[33] リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比0～70%）を含む、リポソーム、

[34] さらに、蛋白質を含む[33]のリポソーム、

[35] リポソーム膜が低分子の親水性化合物により親水性化されている、[33]または[34]のリポソーム、

[36] 低分子の親水性化合物が少なくとも1つのOH基を有する化合物である、[35]のリポソーム、

[37] 親水性化合物が、一般式(1)

$$X-R1(R2OH)_n \quad \text{式(1)}$$

で示される[35]のリポソームであって、R1は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、Xはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム、

[38] 親水性化合物が、一般式(2)**H₂N-R3-(R4OH)_n 式(2)**

で示される[35]のリポソームであって、R3は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R4は存在しないかもしくはC1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム、

[39] 親水性化合物が、一般式(3)**H₂N-R5(OH)_n 式(3)**

で示される[35]のリポソームであって、R5は、C1からC40の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、H₂Nはリポソーム脂質またはリンカー蛋白質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、nは自然数を示す、リポソーム、

[40] リポソーム膜にアミノアルコール類を結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、[35]のリポソーム、

[41] リポソーム膜にトリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパンからなる群から選択される親水性化合物を共有結合により結合させることによりリポソーム膜が親水性化されている、[40]のリポソーム、

[42] [33]から[41]のいずれかのリポソームに薬剤または遺伝子を封入したリポソーム製剤、

[43] 薬剤が、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病、高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODNやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、抗体医薬からなる群から選択される[42]のリポソーム製剤、

[44] 経口投与用製剤である、[42]または[43]のリポソーム製剤、

[45] 非経口投与用製剤である、[42]または[43]のリポソーム製剤、

[46] 薬剤が腫瘍用薬剤である、[43]のリポソーム製剤を含む抗癌剤、

[47] 経口投与用抗癌剤である、[46]の抗癌剤、ならびに

[48] 非経口投与用抗癌剤である、[46]の抗癌剤。

【発明の効果】**【0014】**

リポソームを構成する組成の種類および量を調節することにより、安定性の高いリポソームを得ることができた。さらに、特定の親水性化合物でリポソームを親水性化することにより、従来のリポソームより優れた安定性等の特性を有するリポソームを得ることができた。

【0015】

本発明の実施例に示したように、各種糖鎖とヒト血清アルブミン等のヒト由来蛋白質を含む生体由来蛋白質(リンカー)とリポソームとが結合したリポソームを作製し、マウスでの各種組織への体内動態、特に癌組織への取込についてエールリッヒ固形癌担癌マウスを用いて解析した結果、糖鎖の分子構造の差を利用することによって、実際の生体におい

てリポソームの各種組織への体内動態を促進あるいは抑制して制御することができ、これに基づく効率の良い癌組織をはじめとする目的組織（血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織、リンパ節）へのターゲティング機能をDDS材料に付与することができることが明らかとなった。このように、本発明により、医学・薬学分野において極めて有用な、標的指向性を制御し得るリポソームを提供することができた。また、この際リポソーム表面に結合させる糖鎖密度を制御することにより、より標的指向性の高い糖鎖結合リポソームを得ることができた。

【0016】

また、本発明の上記糖鎖修飾リポソームは腸管吸収性に優れ、腸管を経由するという、従来のリポソーム使用製剤にはみられない新たな投与形態で投与可能なものであるという点で画期的なものである。さらに、腸管吸収性並びに各種組織（血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、膵臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、眼、癌組織、炎症組織、リンパ節）への体内動態は、リポソームに対する糖鎖結合量の設定と、糖鎖の選択によって制御することができ、これにより、効率的、かつ副作用がなく安全に、薬剤あるいは遺伝子等を腸管そして血中経由で生体組織に移行することが可能となり、医学、薬学分野において特に有用なものである。

【0017】

さらに、本発明の糖鎖修飾親水性化リポソームおよび糖鎖非修飾親水性化リポソームに、抗癌剤を封入し癌を担持する被験体に経口または非経口で投与した場合、癌組織に標的指向的に集積し、癌の成長を抑制することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

以下、本発明をさらに詳細に説明する。

【0019】

本発明は、表面に種々の糖鎖を有する標的指向性リポソームおよび腸管吸収制御性リポソームである。本発明において、標的指向性とは生体内に投与したときに特定の組織や器官または癌等の疾患部位等の標的部位に特異的に到達し取り込まれ得る性質をいう。また、腸管吸収制御性とは、腸管経由で生体内に取り込まれる性質、すなわち腸管吸収性であって、さらに取り込まれる速度、程度等を制御し得る性質をいう。

【0020】

リポソームとは、通常、膜状に集合した脂質層および内部の水層から構成される閉鎖小胞を意味する。本発明のリポソームは、図1～12、23～26および32～38に示されるように、その表面すなわち脂質層に糖鎖が、結合している、糖鎖は直接リポソームの脂質層に結合していてもよいし、ヒト血清アルブミン等のヒト由来蛋白質を含む生体蛋白質であるリンカー蛋白質を介して、共有結合していてもよい。糖鎖は、その種類と密度が制御されて結合している。

【0021】

糖鎖は、本発明の腸管吸収制御性リポソームおよび本発明の標的指向性リポソームの標的組織や器官または癌などに応じて種々のものを用いることができる。

【0022】

病変部の血管内皮細胞に発現するE-セレクトイン、P-セレクトインと白血球の細胞膜上に発現している糖鎖であるシアリルルイスXが強く結合することが知られている。本リポソームはこのシアリルルイスX糖鎖またはこれと同様にE-セレクトイン、P-セレクトイン等のセレクトイン様の糖鎖結合部位を有する蛋白質に反応することができる糖鎖が糖鎖の種類と密度が制御されて結合しているリポソームであり、血管内皮細胞がE-セレクトイン、P-セレクトイン等を発現している癌等の病巣部位に特異的に集積すると考えられる。またE-セレクトイン、P-セレクトイン等を発現している部位は炎症や血管新生が生じている部位であり、そのような部位の血管は内皮細胞の細胞間隙が拡大しており、集積したリポソームがその隙間から病巣部位およびその周囲に拡散するものと考えられる。拡散したリポソームは病巣部位およびその周囲の各種細胞に取り込まれ（endocytosis）、細胞内で内包している薬剤を

放出する。このようなメカニズムで炎症性疾患または癌などに効果を発揮する。

【0023】

本発明のリポソームに結合させる糖鎖として、上述のようにE-セレクトリン、P-セレクトリン等のレクチン様の糖鎖結合部位を有する蛋白質に反応することができる糖鎖が挙げられる。ここで、E-セレクトリン、P-セレクトリン等とは、セレクトリン、DC-SIGN、DC-SIGNR、コレクチン、マンノース結合蛋白質等のC-タイプレクチン、シグレック等のIタイプレクチン、マンノース-6-リン酸受容体などのPタイプレクチン、Rタイプレクチン、Lタイプレクチン、Mタイプレクチン、ガレクチンなどの各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）をいう。本発明のリポソームが標的とする細胞は、細胞により発現するレクチン様の糖鎖結合部位を有する蛋白質の種類が異なるので、該蛋白質の種類に応じて糖鎖を選択することにより特定の細胞に特異的に指向性を有するリポソームを得ることができる。

【0024】

例えば、腸管吸収制御性リポソームとして、3'-シアリルラクトース三糖鎖（図23に構造式を示す。以下、同様）、6'-シアリルラクトース三糖鎖（図24）、3'-シアリルラクトサミン糖鎖（図25）および6'-シアリルラクトサミン糖鎖（図26）が挙げられ、標的指向性リポソームとしてアルファ1,2マンノビオース二糖鎖（図1）、アルファ1,3マンノビオース二糖鎖（図2）、アルファ1,4マンノビオース二糖鎖（図3）、アルファ1,6マンノビオース二糖鎖（図4）、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖（図5）、オリゴマンノース3五糖鎖（図6）、オリゴマンノース4b六糖鎖（図7）、オリゴマンノース5七糖鎖（図8）、オリゴマンノース6八糖鎖（図9）、オリゴマンノース7九糖鎖（図10）、オリゴマンノース8十糖鎖（図11）、オリゴマンノース9十一糖鎖（図12）、ルイスX型三糖鎖（図33）、シアリルルイスX型四糖鎖（図34）、ラクトース二糖鎖（図35）、2'-フコシルラクトース三糖鎖（図36）、ジフコシルラクトース四糖鎖（図37）、3-フコシルラクトース三糖鎖（図38）が挙げられる。

【0025】

本発明に用いられるリポソームについては、膜安定性をよくすること、封入される薬物や遺伝子などのものをなくすこと、膜面の親水性化処理をできるようにすること、蛋白質を各種密度で結合できるようにすること、糖鎖を各種密度で結合できるようにすること、などを可能にするために、鋭意努力をして、以下のような各種の脂質と糖脂質などを構成成分とするリポソームを作製した。本発明のリポソームを構成する脂質としては、例えば、フォスファチジルコリン類、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩類、ジセチルリン酸類、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類、コレステロール類等が挙げられ、フォスファチジルコリン類としては、ジミリストイルフォスファチジルコリン、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、ジステアロイルフォスファチジルコリン等が、また、フォスファチジルエタノールアミン類としては、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等が、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類としては、ジミリストイルフォスファチジン酸、ジパルミトイルフォスファチジン酸、ジステアロイルフォスファチジン酸、ジセチルリン酸等が、ガングリオシド類としては、ガングリオシドGM1、ガングリオシドGD1a、ガングリオシドGT1b等が、糖脂質類としては、ガラクトシルセラミド、グルコシルセラミド、ラクトシルセラミド、フォスファチド、グロボシド等が、フォスファチジルグリセロール類としては、ジミリストイルフォスファチジルグリセロール、ジパルミトイルフォスファチジルグリセロール、ジステアロイルフォスファチジルグリセロール等が好ましい。このうち、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類もしくは糖脂質類、コレステロール類はリポソームの安定性を上昇させる効果を有するので、構成脂質として添加するのが望ましい。

【0026】

例えば、本発明のリポソームを構成する脂質として、フォスファチジルコリン類（モル

比0~70%)、フォスファチジルエタノールアミン類(モル比0~30%)、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0~30%)、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質(モル比0~40%)、ならびにコレステロール類(モル比0~70%)を含むものが挙げられる。リポソーム自体は、周知の方法に従い製造することができるが、これには、薄膜法、逆層蒸発法、エタノール注入法、脱水-再水和法等を挙げることができる。

【0027】

また、超音波照射法、エクストルージョン法、フレンチプレス法、ホモジナイゼーション法等を用いて、リポソームの粒子径を調節することも可能である。本発明のリポソーム自体の製法について、具体的に述べると、例えば、まず、フォスファチジルコリン類、コレステロール、フォスファチジルエタノールアミン類、フォスファチジン酸類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類を配合成分とする脂質と界面活性剤コール酸ナトリウムとの混合ミセルを調製する。

【0028】

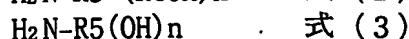
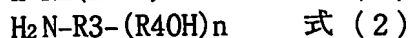
とりわけ、フォスファチジン酸類もしくはジセチルホスフェート等の長鎖アルキルリン酸塩類の配合は、リポソームを負に荷電させるために必須であり、フォスファチジルエタノールアミン類の配合は親水性化反応部位として、ガングリオシド類または糖脂質類またはフォスファチジルグリセロール類の配合はリンカー蛋白質の結合部位として必須のものである。ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質はリポソーム中で集合し、リンカー蛋白質を結合させる足場(ラフト)として機能する。本発明のリポソームは、このような蛋白質を結合させるラフトが形成されることによりさらに安定化される。すなわち、本発明のリポソームは、リンカー蛋白質を結合させるためのガングリオシド、糖脂質、フォスファチジルグリセロール類、スフィンゴミエリン類およびコレステロール類からなる群から選択される少なくとも1種の脂質のラフトが形成されたリポソームを含む。

【0029】

そして、これにより得られる混合ミセルの限外濾過を行うことによりリポソームを作製する。

【0030】

本発明において使用するリポソームは、通常のもので使用できるが、その表面は親水性化されていることが望ましい。上述のようにしてリポソームを作製した後にリポソーム表面を親水性化する。リポソーム表面の親水性化は、リポソーム表面に親水性化合物を結合させることにより行う。親水性化に用いる化合物としては、低分子の親水性化合物、好ましくは少なくとも1つのOH基を有する低分子の親水性化合物、さらに好ましくは、少なくとも2つのOH基を有する低分子の親水性化合物が挙げられる。このような親水性化合物として、例えば、トリス(ヒドロキシアシル)アミノメタン等のアミノアルコール等が挙げられ、さらに具体的には、トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノエタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノメタン、トリス(ヒドロキシメチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシエチル)アミノプロパン、トリス(ヒドロキシプロピル)アミノプロパン等が挙げられる。例えば、リポソーム膜の脂質フォスファチジルエタノールアミン上に架橋用の2価試薬とトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンとを用いてリポソーム表面を親水性化する。親水性化合物の一般式は、下記式(1)、式(2)、式(3)等で示される。



【0031】

ここで、R1、R3およびR5は、C1からC40、好ましくはC1からC20、さらに好ましくはC1からC10の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示し、R2、R4は存在しないかもしくはC1からC40、好ましくはC1からC20、さらに好ましくはC1からC10の直鎖または分岐鎖の炭化水素鎖を示す。Xはリポソーム脂質と直接または架橋用の二価試薬と結合する反応性官能基を示し、例えば、COOH、NH、NH₂、CHO、SH等が挙げられる。nは自然数を示す。

【0032】

このような親水性化合物で親水性化を行ったりポソームの表面は、薄く親水性化合物で覆われている。但し、その親水性化合物の覆いの厚みは小さいので、リポソームに糖鎖を結合させた場合であっても、糖鎖等の反応性を抑制することはない。

【0033】

リポソームの親水性化は、従来公知の方法、例えば、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、無水マレイン酸共重合体等を共有結合により結合させたリン脂質を用いてリポソームを作成する方法（特開2000-302685号）等の方法を採用することによっても行うことができる。

【0034】

このうち、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化することが特に好ましい。

【0035】

本発明のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いる手法は、ポリエチレングリコールなどを用いる従来の親水性化方法と比較していくつかの点で好ましい。例えば、本発明のように糖鎖をリポソーム上に結合してその分子認識機能を標的指向性に利用するものでは、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンは低分子量物質であるので従来のポリエチレングリコールなどの高分子量物質を用いる方法に比べて、糖鎖に対する立体障害となりにくく標的細胞膜面上のレクチン（糖鎖認識蛋白質）による糖鎖分子認識反応の進行を妨げないので特に好ましい。

【0036】

また、本発明によるリポソームは該親水化処理後においても粒径分布や成分組成、分散特性が良好であり、長時間の保存性や生体内安定性も優れているのでリポソーム製剤化して利用するために好ましい。

【0037】

トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いてリポソーム表面を親水性化するには、例えばジミリスチルフォスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質を用いて、常法により得たりポソーム溶液にビススルフォスクシニミチルスベレート、ジスクシニミチルグルタレート、ジチオビススクシニミチルプロピオネート、ジスクシニミチルスベレート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミチルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミチルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミチルスクシネート等の2価試薬を加えて反応させることにより、リポソーム膜上のジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン等の脂質に2価試薬を結合させ、次いでトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを、該2価試薬の一方の結合手と反応させることにより、リポソーム表面にトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを結合せしめる。

【0038】

このように、リポソームを親水性化処理したりポソームは、生体内で極めて安定であり、後述のように標的指向性を有する糖鎖を結合しなくても、生体内での半減期が長いこと、ドラッグデリバリーシステムにおけるドラッグ担体として好適に用いることができる。本発明は、表面を低分子化合物で親水性化したりポソームをも包含する。

【0039】

本発明は、上記の親水性化合物を用いて親水性化した糖鎖の結合していないリポソームそのものをも包含する。このような親水性化したりポソームは、リポソーム自体の安定

性が高まり、また糖鎖を結合したときに糖鎖の認識性が高まるという利点がある。

【0040】

本発明のリポソームは、例えば、リポソームの構成脂質が、フォスファチジルコリン類（モル比0～70%）、フォスファチジルエタノールアミン類（モル比0～30%）、フォスファチジン酸類、長鎖アルキルリン酸塩およびジセチルリン酸類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～30%）、ガングリオシド類、糖脂質類、フォスファチジルグリセロール類およびスフィンゴミエリン類からなる群から選択される1種以上の脂質（モル比0～40%）、ならびにコレステロール類（モル比0～70%）を含む、リポソームである。

【0041】

本発明は、さらにリポソームに上記に親水性化合物を結合させて、リポソームを親水性化する方法をも包含する。また、糖鎖の結合していない親水性化したリポソームをも包含する。糖鎖の結合していないリポソームに糖鎖を結合することにより、本発明の標的指向性リポソームまたは腸管吸収性リポソームを製造することができる。

【0042】

本発明においては、上記のようにして作製したリポソームに、上記の糖鎖のいずれかを直接結合させてもよいし、さらに、糖鎖をリンカー蛋白質を介して結合させてもよい。この際、リポソームに結合させる糖鎖の種類は1種類に限らず、複数の糖鎖を結合させてもよい。この場合の複数の糖鎖は同じ組織または器官の細胞表面に共通して存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する複数の糖鎖であってもよいし、異なる組織または器官の細胞表面に存在する異なるレクチンに対して結合活性を有する糖鎖であってもよい。前者のような複数の糖鎖を選択することにより、特定の標的組織または器官を確実に指向することができ、後者のような複数の糖鎖を選択することにより、1種類のリポソームに複数の標的を指向させることができ、マルチパーパスな標的指向性リポソームを得ることができる。

【0043】

なお、糖鎖をリポソームに結合させるには、リポソームの製造時にリンカー蛋白質および／または糖鎖を混合し、リポソームを製造させつつ糖鎖をその表面に結合させることも可能であるが、あらかじめリポソーム、リンカー蛋白質および糖鎖を別途準備し、製造が完了したリポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させたほうが望ましい。これは、リポソームにリンカー蛋白質および／または糖鎖を結合させることにより、結合させる糖鎖の密度を制御できるからである。

【0044】

糖鎖のリポソームへの直接結合は、以下に述べるような方法で行うことができる。

糖鎖を糖脂質として混合してリポソームを製造するか、製造後のリポソームのリン脂質に糖鎖を結合するとともに糖鎖密度を制御する。

【0045】

リンカー蛋白質を用いて糖鎖を結合させる場合、リンカー蛋白質としては、生体由来の蛋白質、特にヒト由来蛋白質を用いるのが好ましい。生体由来の蛋白質は限定されないが、アルブミン等の血液中に存在する蛋白質、その他生体に存在する生理活性物質等が挙げられる。例えば、ヒト血清アルブミン（HSA）、ウシ血清アルブミン（BSA）等の動物の血清アルブミンが挙げられるが、特にヒト血清アルブミンを使用する場合は、各組織に対する取り込みが多いことがマウスについての実験により確かめられている。

【0046】

本発明のリポソームは、非常に安定であり、リポソームを形成した後に蛋白質を結合させたり、リンカー蛋白質を結合させたり、糖鎖を結合させるという後処理が可能である。従って、リポソームを大量に製造した後に、目的に応じてそれぞれ異なる蛋白質を結合させたり、リンカー蛋白質や糖鎖を結合させることにより、目的に応じた種々のリポソームを製造することが可能である。

【0047】

本発明のリポソームには、糖鎖がリンカー蛋白質を介して、あるいはリポソームを構成する脂質に直接結合している。本発明のリポソームは、糖脂質や糖タンパク質等の複合糖質型リガンドを有し、低分子化合物で親水化処理されているリポソームである。

【0048】

また、後述のように、本発明の標的指向性リポソームを医薬として用いる場合、該リポソームは医薬効果を有する化合物を含んでいる必要がある。該医薬効果を有する化合物は、リポソーム中に封入させるか、あるいはリポソーム表面に結合させればよいが、リンカー蛋白質として、医薬効果を有する蛋白質を用いてもよい。この場合、蛋白質がリポソームと糖鎖を結合させるためのリンカー蛋白質および医薬効果を有する蛋白質を兼ねることもある。薬効を有する蛋白質としては、生理活性蛋白質等が挙げられる。

【0049】

糖鎖をリンカー蛋白質を介してリポソームへ結合させるには以下に述べる方法で行えばよい。

【0050】

まずリポソーム表面に蛋白質を結合させる。リポソームを、 NaIO_4 、 $\text{Pb}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_4$ 、 NaBiO_3 等の酸化剤で処理して、リポソーム膜面に存在するガングリオシドを酸化し、次いで、 NaBH_3CN 、 NaBH_4 等の試薬を用いて、リンカー蛋白質とリポソーム膜面上のガングリオシドを、還元的アミノ化反応により結合させる。このリンカー蛋白質も、親水性化するのが好ましく、これにはリンカー蛋白質にヒドロキシ基を有する化合物を結合させるが、例えば、ビススルフォスクシニミデルスベラート、ジスクシニミデルグルタレート、ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、ジスクシニミデルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミデルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミデルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミデルスクシネート等の2価試薬を用いて、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物をリポソーム上のリンカー蛋白質と結合させればよい。

【0051】

これを具体的に述べると、まず、リンカー蛋白質の全てのアミノ基に架橋用2価試薬の一端を結合する。そして、各種糖鎖の還元末端をグリコシルアミノ化反応して得られる糖鎖グリコシルアミン化合物を調製し、この糖鎖のアミノ基とリポソーム上の上記で結合された架橋2価試薬の一部分の他の未反応末端とを結合する。

【0052】

糖鎖および／または親水性化合物とリポソームとの共有結合、または糖鎖および／または親水性化合物とリンカー蛋白質との共有結合は、リポソームが細胞内に取り込まれたときに切断することも可能である。例えば、リンカー蛋白質と糖鎖がジスルフィド結合を介して共有結合されている場合、細胞内で還元されて糖鎖が切断される。糖鎖が切断されることによりリポソーム表面が疎水性になり、生体膜と結合し膜安定性が乱れリポソーム中に含まれる薬剤が放出される。

【0053】

次に、このようにして得られる糖鎖結合リポソーム膜面上蛋白質の表面に糖鎖が結合していない未反応で残っている大部分の2価試薬未反応末端を用いて親水性化処理を行う。つまり、このリポソーム上蛋白質に結合している2価試薬の未反応末端とトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン等の上述の親水性化に用いる化合物との結合反応を行い、リポソーム表面全体を親水性化する。

【0054】

リポソーム表面およびリンカー蛋白質の親水性化は、各種組織への移行性、および血中における滞留性および各種組織への移行性を向上させる。これは、リポソーム表面およびリンカー蛋白質表面が親水性化されることによって、糖鎖以外の部分が、各組織等においてはあたかも生体内水分であるかのように見え、これにより、標的以外の組織等に認識されず、糖鎖のみがその標的組織のレクチン（糖鎖認識蛋白質）により認識されることに起因するものと思われる。

【0055】

次いで、糖鎖をリポソーム上のリンカー蛋白質に結合させる。これには、糖鎖を構成する糖類の還元末端を、 NH_4HCO_3 、 $\text{NH}_2\text{COONH}_4$ 等のアンモニウム塩を用いてグリコシルアミノ化し、次いで、ビススルフォスクシニミダルスベラート、ジスクシニミダルグルタレート、ジチオビススクシニミダルプロピオネート、ジスクシニミダルスベラート、3,3'-ジチオビススルフォスクシニミダルプロピオネート、エチレングリコールビススクシニミダルスクシネート、エチレングリコールビススルフォスクシニミダルスクシネート等の2価試薬を用いて、リポソーム膜面上に結合したリンカー蛋白質と、上記グリコシルアミノ化された糖類とを結合させ、図1～12、23～26および33～38に示されるようなリポソームを得る。なお、これらの糖鎖は市販されている。

【0056】

本発明のリポソーム、糖鎖等結合リポソームの平均粒径は、30～500nm、好ましくは50～350nmである。また、本発明のリポソームは、負に荷電していることが望ましい。負に荷電していることにより、生体中の負に荷電している細胞との相互作用を防ぐことができる。本発明のリポソーム表面の平均ゼータ電位は、生理食塩水中において、37℃で、-50～-10mV、好ましくは-40～0mV、さらに好ましくは-30～-10mVである。

【0057】

さらに、糖鎖を結合させた場合の糖鎖の結合密度は、リポソームに結合させるリンカー蛋白質1分子当たり1～60個、好ましくは1～40個、さらに好ましくは1～20個である。また、リポソーム1粒子当りは、リンカー蛋白質を用いる場合は、1～30000個、好ましくは1～20000個、さらに好ましくは1～10000個、あるいは100～30000個、好ましくは100～20000個、さらに好ましくは100～10000個、あるいは500～30000個、好ましくは500～20000個、さらに好ましくは500～10000個である。リンカー蛋白質を用いない場合は、リポソーム1粒子当たり最高1～500000個、好ましくは1～300000個、さらに好ましくは1～100000個以上の糖鎖を結合させることができる。

【0058】

本発明においては、使用する糖鎖の構造と糖鎖結合量を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。

【0059】

また、糖鎖の種類と糖鎖結合量によっては腸管での吸収制御性を高めることもできる。腸管吸収制御性を高める糖鎖と特定の組織または器官への指向性を有する糖鎖の両方をリポソームに結合させることにより、特定組織または器官への指向性と腸管吸収制御性の両方の特性を併せ持ったリポソームを作製することができる。

【0060】

上述のように、本発明の標的指向性リポソームは糖鎖の種類と糖鎖結合量により特異的に結合するレクチンが決まり、特定の組織または器官に特異的に到達する。また、糖鎖構造と糖鎖結合量を選択することにより癌組織等の疾患部位に到達させることも可能である。

【0061】

本発明においては、使用する糖鎖の構造と糖鎖結合量を種々選択することにより、各標的細胞、組織に対する指向性を制御することができる。本発明のリポソームは、糖鎖により血中、肝臓、脾臓、肺、脳、小腸、心臓、胸腺、腎臓、脾臓、筋肉、大腸、骨、骨髄、癌組織、炎症組織およびリンパ節等の組織または器官を指向する。例えば、実施例における図13、16、17、18、21および22が示すように、アルファ1,2マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3マンノピオース二糖鎖、アルファ1,4マンノピオース二糖鎖、アルファ1,6マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖およびオリゴマンノース9十一糖鎖を結合したリポソームはすべて血中、肺、脳、癌組織、心臓および小腸への指向性が高い。また、図14が示すように、アルファ1,2マンノピオース二

糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖を結合したリポソームは、肝臓への指向性が高い。また、図15が示すようにアルファ1,2マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームは脾臓への指向性が高い。また、図19が示すようにアルファ1,2マンノピオース二糖鎖、アルファ1,4マンノピオース二糖鎖、アルファ1,6マンノピオース二糖鎖を結合したリポソームはリンパ節への指向性が高い。さらに、オリゴマンノース6八糖鎖を結合したリポソームは胸腺への指向性が高い。

【0062】

また、本発明の図23～26に示されるリポソームは、全般的に腸管吸収性は極めて高いものの、さらに、リポソーム上の糖鎖の密度の調節を行うことにより、腸管吸収性を制御し、より効率的に標的部位へ薬剤を移行させることが可能となり、副作用の軽減化を図ることができる。例えば、実施例における図27～30においては、上記4種の糖鎖修飾リポソームにおける糖鎖結合量を3段階に変更した場合における、腸管から血中への移行性（すなわち腸管吸収性）を示す。

【0063】

なお、この糖鎖結合量の変更は、リンカー蛋白質結合リポソームに対して糖鎖を3段階の濃度で(1)50 μ g、2)200 μ g、3)1mg)で結合せしめることにより行ったものである。これによれば、6'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン糖鎖の場合、糖鎖密度を高くするにつれ、腸管吸収性が順次低下するが、3'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン糖鎖の場合は腸管吸収性が逆に上昇する。これらのことは、腸管吸収性は、リポソーム上の糖鎖の結合量により、糖鎖の種類毎に異なることを示す。したがって、糖鎖の種類毎にリポソーム上の糖鎖結合量を適宜設定することにより、腸管吸収性を制御することが可能となる。

【0064】

本発明のリポソームに、医薬効果を有する化合物を含ませることにより、特定の組織または器官にリポソームが到達し、その組織または器官の細胞にリポソームが取り込まれ、医薬効果を有する化合物を放出し、医薬効果を奏する。

【0065】

医薬効果を有する化合物は限定されず、公知の蛋白質、公知の医薬化合物を広く用いることが可能である。抗癌剤等の特定の疾患に対する医薬化合物等を含ませることにより、本発明のリポソームを特定の疾患の治療薬として用いることができる。さらに、本発明のリポソームに含める医薬効果を有する化合物としては、遺伝子治療用DNA、RNA、siRNA等が挙げられる。

【0066】

本発明のリポソームに含ませる医薬化合物としては、アルキル化系抗癌剤、代謝拮抗剤、植物由来抗癌剤、抗癌性抗生物質、BRM・サイトカイン類、白金錯体系抗癌剤、免疫療法剤、ホルモン系抗癌剤、モノクローナル抗体等の腫瘍用薬剤、中枢神経用薬剤、末梢神経系・感覚器官用薬剤、呼吸器疾患治療薬剤、循環器用薬剤、消化器用薬剤、ホルモン系用薬剤、泌尿器・生殖器用薬剤、外用薬剤、ビタミン・滋養強壮剤、血液・体液用薬剤、代謝性医薬品、抗生物質・化学療法薬剤、検査用薬剤、抗炎症剤、眼疾患薬剤、中枢神経系薬剤、自己免疫系薬剤、循環器系薬剤、糖尿病。高脂血症等の生活習慣病薬剤または経口、経肺、経皮膚もしくは経粘膜のための各種薬剤、副腎皮質ホルモン、免疫抑制剤、抗菌薬、抗ウイルス薬、血管新生抑制剤、サイトカインやケモカイン、抗サイトカイン抗体や抗ケモカイン抗体、抗サイトカイン・ケモカイン受容体抗体、siRNA、miRNA、smRNA、アンチセンス ODNやDNAなどの遺伝子治療関連の核酸製剤、神経保護因子、種々の抗体医薬等が挙げられる。

【0067】

例えば、腫瘍用薬剤として、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、シクロホスファミド、イホスファミド、ブルスファン、塩酸ニムスチン、ミトプロニトール、メルファラン、ダカルバジン、ラニムスチン、リン酸エストラムスチンナトリウムなどのアルキ

ル化剤、メルカプトプリン、チオイノシン（メルカプトプリンリボシド）、メトトレキサート、エノシタピン、シタラピン、塩酸アンシタピン（塩酸サイクロシチジン）、フルオロウラシル、5-FU、テガフル、ドキシフルリジン、カルモフルなどの代謝拮抗剤、エトボシド、硫酸ビンブラスチン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、パクリタキセル、タキソール、塩酸イリノテカン、塩酸ノグテカンなどのアルカロイド等の植物由来抗癌剤、アクチノマイシンD、マイトマイシンC、クロモマイシンA3、塩酸ブレオマイシン、硫酸ブレオマイシン、硫酸ペプロマイシン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸アクリラルビシン（アクリシノマイシンA）、塩酸ピラルビシン、塩酸エピルビシン、ネオカルチノスタチンなどの抗癌性抗生物質、その他、塩酸ミトキサントロン、カルボプラチン、シスプラチン、L-アスパラギナーゼ、アセグラトン、塩酸プロカルバジン、クエン酸タモキシフェン、ウベニメクス、レンチナン、シゾフィラン、酢酸メドロキシプロゲステロン、ホスフェストロール、メピチオスタン、エピチオスタノール等がある。

【0068】

上述のような薬剤を含ませることにより、本発明のリボソームを、癌、炎症等の疾患の治療に用いることができる。

【0069】

なお、医薬効果を有する化合物は、リボソームの中に封入させてもよいし、リボソーム表面に結合させてもよい。例えば、蛋白質は上記のリンカー蛋白質の結合方法と同じ方法で表面に結合させることが可能であり、他の化合物もその化合物が有する官能基を利用することにより、公知の方法で、結合させることができる。また、リボソーム内部への封入は、以下の方法により行う。リボソームへ薬剤等を封入するには、周知の方法を用いればよく、例えば、薬剤等の含有溶液とフォスファチジルコリン類、フォスファチジエタノールアミン類、フォスファチジン酸類もしくは長鎖アルキルリン酸塩類、ガングリオシド類、糖脂質類もしくはフォスファチジルグリセロール類およびコレステロール類を含む脂質を用いてリボソームを形成することにより、薬剤等はリボソーム内に封入される。

【0070】

したがって、本発明のリボソームに、治療あるいは診断に供しうる薬剤あるいは遺伝子を封入することによって得られるリボソーム製剤は、ガン組織、炎症組織、各種組織への移行性が選択的に制御されたものであり、治療薬剤あるいは診断剤の標的細胞、組織への集中による効力の増強あるいは他の細胞、組織に対する薬剤の取り込みの減少による副作用の軽減化等を図れるものである。

【0071】

本発明の糖鎖修飾リボソームは、医薬組成物として、種々の形態で投与することができる。このような投与形態としては、点眼剤等による点眼投与、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、シロップ剤等による経口投与、あるいは注射剤、点滴剤、座薬などによる非経口投与を挙げることができる。かかる組成物は、公知の方法によって製造され、製剤分野において通常用いられる担体、希釈剤、賦形剤を含む。たとえば、錠剤用の担体、賦形剤としては、ゲル化剤、乳糖、ステアリン酸マグネシウムなどが使用される。注射剤は、本発明の糖鎖結合リボソームを通常注射剤に用いられる無菌の水性もしくは油性液に溶解、懸濁または乳化することによって調製する。注射用の水性液としては、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液などが使用され、適当な溶解補助剤、たとえばアルコール、プロピレングリコールなどのポリアルコール、非イオン界面活性剤などと併用しても良い。油性液としては、ゴマ油、大豆油などが使用され、溶解補助剤としては安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどを併用しても良い。

【0072】

本発明の医薬組成物の投与経路は、限定されず、点眼、経口投与、静脈注射、筋肉注射等がある。投与量は、疾患の重篤度等により適宜決定できるが、本発明の組成物の医薬的に有効量を患者に投与する。ここで、「医薬的に有効量を投与する」とは、各種疾患を治療するのに適切なレベルの薬剤を患者に投与することをいう。本発明の医薬組成物の投与回数は適宜患者の症状に応じて選択される。

【0073】

表面に糖鎖を有するリポソームは、非経口投与（静注投与）および経口投与に適し、投与量は、標的指向性を有さない従来のリポソーム製剤に対して、数分の1から数千分の1でよい。例えば、体重1kg当り、リポソームに含ませる薬剤の量で0.0001~1000mg、好ましくは、0.0001~10mg、さらに好ましくは、0.0001~0.1mgでよい。また、本発明のリポソームは、標的指向性を有する糖鎖を含まず親水性化合物を結合させたリポソームも含むが、該リポソームの場合も親水性処理により生体内での安定性が高く、半減期も長いので、低用量で十分な効果を有する。

【0074】

また、本発明の医薬組成物を診断用に用いる場合は、リポソームに蛍光色素、放射性化合物等の標識化合物を結合させる。該標識化合物結合リポソームが患部に結合し、標識化合物が患部細胞に取り込まれ、該標識化合物の存在を指標に疾患を検出・診断することができる。

【0075】

本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【実施例1】

【0076】

リポソームの調製

リポソームは既報の手法（Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65）により、改良型コール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ35:40:5:15:5の割合の合計脂質量45.6mgにコール酸ナトリウムを46.9mg添加し、クロロホルム/メタノール溶液3mlに溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜をTAPS緩衝液（pH 8.4）3mlに懸濁、超音波処理して、透明なミセル懸濁液を得た。さらに、ミセル懸濁液をPM10膜（Amicon Co., USA）とPBS緩衝液（pH 7.2）を用いた限外濾過にかけ均一リポソーム（平均粒径100nm）10mlを調製した。

【実施例2】

【0077】

リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例1で調製したリポソーム溶液10mlをXM300膜（Amicon Co., USA）とCBS緩衝液（pH 8.5）を用いた限外濾過にかけ溶液のpHを8.5にした。次に、架橋試薬bis(sulfosuccinimidyl)suberate（BS3; Pierce Co., USA）10mlを加え、25℃で2時間攪拌した。その後、更に7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンとBS3との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液をXM300膜とCBS緩衝液（pH 8.5）で限外濾過にかけた。次に、CBS緩衝液（pH 8.5）1mlに溶かしたtris(hydroxymethyl)aminomethane 40mgをリポソーム液10mlに加えて、25℃で2時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合したBS3とtris(hydroxymethyl)aminomethaneとの化学結合反応を完結した。これにより、リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上にtris(hydroxymethyl)aminomethaneの水酸基が配位して水和親水性化された。

【実施例3】

【0078】

リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン（HSA）の結合

既報の手法（Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65）により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例2で得られた10mlのリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを1mlのTAPS緩衝液（pH 8.4）に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム43mgを

加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 8.0)で限外濾過することにより酸化されたリポソーム10mlを得た。このリポソーム液に、20mgのヒト血清アルブミン(HSA)を加えて25℃で2時間攪拌し、次にPBS(pH 8.0)に2M NaBH₃CN 100 μ lを加えて10℃で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドとHSAとのカップリング反応でHSAを結合した。そして、XM300膜とPBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過をした後、HSA結合リポソーム液10mlを得た。

【実施例4】

【0079】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,2マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ1,2マンノビオース二糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,2マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,2マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,2マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図1で示されるアルファ1,2マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A2) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例5】

【0080】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,3マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ1,3マンノビオース二糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,3マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,3マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,3マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図2で示されるアルファ1,3マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A3) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例6】

【0081】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,4マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ1,4マンノビオース二糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,4マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSP

がリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,4マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,4マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図3で示されるアルファ1,4マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A4) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例7】

【0082】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,6マンノビオース二糖鎖の結合

アルファ1,6マンノビオース二糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,6マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,6マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,6マンノビオース二糖鎖の結合を行った。その結果、図4で示されるアルファ1,6マンノビオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A6) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例8】

【0083】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖の結合

アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖の結合を行った。その結果、図5で示されるアルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称:A36) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例9】

【0084】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース3五糖鎖の結合

オリゴマンノース3五糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース3五糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sul

fosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース3五糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース3五糖鎖の結合を行った。その結果、図6で示されるオリゴマンノース3五糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 3) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例10】

【0085】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース4b六糖鎖の結合

オリゴマンノース4b六糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース4b六糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース4b六糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース4b六糖鎖の結合を行った。その結果、図7で示されるオリゴマンノース4b六糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 4b) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例11】

【0086】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース5七糖鎖の結合

オリゴマンノース5七糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース5七糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース5七糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース5七糖鎖の結合を行った。その結果、図8で示されるオリゴマンノース5七糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 5) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例12】

【0087】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース6八糖鎖の結合

オリゴマンノース6八糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース6八糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて

て7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース6八糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース6八糖鎖の結合を行った。その結果、図9で示されるオリゴマンノース6八糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 6) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例13】

【0088】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース7九糖鎖の結合

オリゴマンノース7九糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース7九糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース7九糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース7九糖鎖の結合を行った。その結果、図10で示されるオリゴマンノース7九糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 7) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例14】

【0089】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース8十糖鎖の結合

オリゴマンノース8十糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース8十糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース8十糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース8十糖鎖の結合を行った。その結果、図11で示されるオリゴマンノース8十糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man 8) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例15】

【0090】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのオリゴマンノース9十一糖鎖の結合

オリゴマンノース9十一糖鎖(Calbiochem Co., USA)50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してオリゴマンノース9十一糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA)1mgを加えて25℃で2時間、続

いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のオリゴマンノース9十一糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにオリゴマンノース9十一糖鎖の結合を行った。その結果、図12で示されるオリゴマンノース9十一糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム(略称: Man9) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例16】

【0091】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合

比較試料としてのリポソームを調製するために、実施例3で得たリポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図31で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合した比較試料としてのリポソーム(略称: TRIS) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm)が得られた。

【実施例17】

【0092】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上の親水性化処理

実施例4～15において調製された12種類の糖鎖が結合したリポソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリポソーム上のHSA蛋白質表面の水和性化処理を行った。12種の糖鎖結合リポソーム2mlに、別々に、tris(hydroxymethyl)aminomethane 13mgを加えて、25℃で2時間、その後7℃で一晩攪拌した後、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である水和性化処理された12種類の糖鎖結合リポソーム複合体(略称: A2、A3、A4、A6、A36、Man3、Man4、Man5、Man6、Man7、Man8、Man9)を各2mlを得た。

【実施例18】

【0093】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例4～15および実施例17で調製した12種の糖鎖結合リポソーム複合体のin vitroでのレクチン結合活性は、常法(Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505)に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン(Con A; R&D Systems Co., USA)を96穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフェチュイン0.1 μ gとともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体(蛋白質量として、0.01 μ g、0.04 μ g、0.11 μ g、0.33 μ g、1 μ g)を加え、4℃で2時間インキュベートした。PBS(pH 7.2)で3回洗浄した後、horseradish peroxidase(HRP)結合ストレプトアビジンを添加し、さらに4℃で1時間インキュベート、PBS(pH 7.2)で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー(Molecular Devices Corp., USA)で測定した。フェチュインのビオチン化は、sulfo-NHS-biotin reagent(Pierce Co., USA)処理後、Centricon-30(Amicon Co., USA)により精製した。HRP結合ストレプトアビジンは、HRPの酸化とNaBH₃CNを用いた還元アミノ化法によるストレプトアビジンの結合により調製した。この測定結果を表1に示す。

【0094】

【表 1】

標的指向性リボソーム

表 1: 各種の糖鎖結合リボソーム複合体がレクチン結合活性阻害効果を示す実験結果

リボソーム 複合体	リボソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.006 μg	0.02 μg	0.06 μg	0.17 μg	0.5 μg
A2	0.192	0.196	0.192	0.169	0.155
A3	0.178	0.178	0.178	0.170	0.142
A4	0.192	0.196	0.192	0.175	0.153
A6	0.182	0.196	0.182	0.169	0.151
A36	0.205	0.215	0.205	0.192	0.150
Man3	0.201	0.211	0.201	0.177	0.144
Man4	0.171	0.203	0.171	0.157	0.148
Man5	0.215	0.221	0.215	0.196	0.164
Man6	0.210	0.222	0.210	0.207	0.125
Man7	0.213	0.214	0.213	0.183	0.137
Man8	0.211	0.216	0.211	0.188	0.132
Man9	0.208	0.211	0.208	0.186	0.135

【実施例 19】

【0095】

クロラミンT法による各種糖鎖結合リボソームの¹²⁵I標識

クロラミンT (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ3mg/ml 並びに5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 4 から 16 に於いて調製した 12 種の糖鎖結合リボソーム並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソームとを50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて¹²⁵I-NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を15 μl、クロラミンT溶液を10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミンT溶液10 μl を加え、この操作を2 回繰り返した後15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech, Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リボソーム複合体を添加して比活性 (4 × 10⁶ Bq/mg protein) を調整して13 種類の¹²⁵I標識リボソーム液を得た。

【実施例 20】

【0096】

各種の糖鎖結合リボソーム複合体の担癌マウスでの各組織への分布量の測定

Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞 (約2×10⁷ 個) を雄性ddY マウス (7 週齢) 大腿部皮下に移植し、癌組織が0.3~0.6gに発育 (6~8 日後) したものを本実験に用いた。この担癌マウスに実施例 19 により¹²⁵I標識した 12 種の糖鎖並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソーム複合体0.2mlを蛋白質量として3 μg/一匹の割合となるように尾静脈に注入投与し、60 分後に組織 (血液、肝臓、脾臓、肺、脳、癌組織、癌の周囲の炎症組織、リンパ節) を摘出、各組織の放射能をガンマカウンタ (Aloka ARC 300) で測定した。なお、各組織への放射能分布量は、投与全放射能に対する各組織1g 当たりの放射能の割合 (%投与量 /g組織) で表示した。この結果を図 13 ~ 図 22 に示す。

【実施例 21】

【0097】

リボソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への3'-シアリルラクトース三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

3'-シアリルラクトース三糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 μg、又は、2)

200 μ g、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して3'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で2時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 3'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25℃で2時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 3'-シアリルラクトース三糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 22 で示される 3'-シアリルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 3SL-1、2) 3SL-2、3) 3SL-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

【実施例 22】

【0098】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 6'-シアリルラクトース三糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

6'-シアリルラクトース三糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) 50 μ g、又は、2) 200 μ g、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 6'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で2時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 6'-シアリルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25℃で2時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 6'-シアリルラクトース三糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 23 で示される 6'-シアリルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 6SL-1、2) 6SL-2、3) 6SL-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

【実施例 23】

【0099】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への 3'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの 3 種類)

3'-シアリルラクトサミン糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1) 50 μ g、又は、2) 200 μ g、又は、3) 1mg) を 0.25g の NH_4HCO_3 を溶かした 0.5ml 水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ m のフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して 3'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を得た。次に、実施例 3 で得たリポソーム液の一部分 1ml に架橋試薬 3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mg を加えて 25℃で2時間、続いて 7℃で一晩攪拌し、XM300膜と CBS 緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過して DTSSP がリポソーム上の HSA に結合したリポソーム 1ml を得た。次に、このリポソーム液に上記の 3'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物 50 μ g を加えて、25℃で2時間攪拌し、その後 7℃で一晩攪拌し、XM300膜と PBS 緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上の DTSSP に 3'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの 3 種類の図 24 で示される 3'-シアリルラクトサミン糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリポソーム (略称: 1) 3SLN-1、2) 3SLN-2、3) 3SLN-3) 各 2ml (総脂質量 2mg、総蛋白量 200 μ g、平均粒径 100nm) が得られた。

【実施例 24】

【0100】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上への6'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合 (糖鎖結合量が異なるもの3種類)

6'-シアリルラクトサミン糖鎖 (Wako Pure Chemical Co., Japan) (1)50 μ g、又は、2)200 μ g、又は、3)1mg) を0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して6'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、(実施例3)で得たりポソーム液の一部1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したりポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記の6'-シアリルラクトサミン糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに6'-シアリルラクトサミン糖鎖の結合を行った。その結果、糖鎖結合量が異なるもの3種類の図25で示される6'-シアリルラクトサミン糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したりポソーム (略称: 1) 6SLN-1、2) 6SLN-2、3) 6SLN-3) 各2ml (総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm) が得られた。

【実施例25】

【0101】

リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上の親水性化処理

実施例21~24の手段により調整された各12種類の糖鎖が結合したりポソームについて、それぞれ別々に以下の手順によりリポソーム上のHSA 蛋白質表面の親水性化処理を行った。12種の糖鎖結合リポソーム2mlに、別々に、tris(hydroxymethyl) aminomethane 13mgを加えて、25℃で2時間、その後7℃で一晩攪拌した後、XM300膜とPBS緩衝液 (pH 7.2) で限外濾過し未反応物を除去して、最終産物である親水性化処理された12種類の糖鎖結合リポソーム複合体 (略称: 3SL-2、3SL-2、3SL-3、6SL-1、6SL-2、6SL-3、3SLN-1、3SLN-2、3SLN-3、6SLN-1、6SLN-2、6SLN-3) 各2ml (総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g、平均粒径100nm) を得た。

【実施例26】

【0102】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体によるレクチン結合活性阻害効果の測定

実施例21~24および実施例16の手段により調製した各12種の糖鎖結合リポソーム複合体のin vitroでのレクチン結合活性は、常法 (Yamazaki, N. (1999) Drug Delivery System, 14, 498-505) に従いレクチン固定化マイクロプレートを用いた阻害実験で測定した。すなわち、レクチン (E-selectin; R&D Systems Co., USA) を96穴マイクロプレートに固定化した。このレクチン固定化プレートに、比較リガンドであるビオチン化したフコシル化フェチュイン0.1 μ gとともに、濃度の異なる各種の糖鎖結合リポソーム複合体 (蛋白質質量として、0.01 μ g、0.04 μ g、0.11 μ g、0.33 μ g、1 μ g) を加え、4℃で2時間インキュベートした。PBS (pH 7.2) で3回洗浄した後、horseradish peroxidase (HRPO) 結合ストレプトアビジンを添加し、さらに4℃で1時間インキュベート、PBS (pH 7.2) で3回洗浄し、ペルオキシダーゼ基質を添加して室温で静置、405nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (Molecular Devices Corp., USA) で測定した。フコシル化フェチュインのビオチン化は、sulf o-NHS-biotin reagent (Pierce Co., USA) 処理後、Centricon-30 (Amicon Co., USA) により精製した。HRPO結合ストレプトアビジンは、HRPOの酸化とNaBH₃CNを用いた還元アミノ化法によるストレプトアビジンの結合により調製した。この測定結果を表2に示す。

【0103】

【表 2】

腸管吸収制御性リボソーム

表 2

リボソーム 複合体	リボソーム複合体の各濃度 (μg 蛋白質) における阻害効果 (吸光度)				
	0.01 μg	0.04 μg	0.11 μg	0.33 μg	1 μg
3SL-1	0.154	0.147	0.135	0.120	0.097
3SL-2	0.149	0.142	0.124	0.118	0.098
3SL-3	0.214	0.214	0.210	0.183	0.167
6SL-1	0.177	0.171	0.167	0.160	0.114
6SL-2	0.196	0.184	0.169	0.160	0.159
6SL-3	0.214	0.207	0.196	0.192	0.183
3SLN-1	0.219	0.198	0.180	0.164	0.119
3SLN-2	0.155	0.155	0.151	0.119	0.096
3SLN-3	0.216	0.198	0.187	0.146	0.132
6SLN-1	0.257	0.246	0.233	0.200	0.151
6SLN-2	0.250	0.250	0.230	0.199	0.158
6SLN-3	0.248	0.231	0.227	0.201	0.144

【実施例 27】

【0104】

クロラミンT法による各種糖鎖結合リボソームの ^{125}I 標識

クロラミンT (Wako Pure Chemical Co., Japan) 溶液並びに二亜硫酸ナトリウム溶液をそれぞれ3mg/ml 並びに5mg/ml となるように用事調製して用いた。実施例 21 から 24 および実施例 16 により調製した 13 種の糖鎖結合リボソーム並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソームとを50 μl ずつ別々にエッペンチューブに入れ、続いて ^{125}I -NaI (NEN Life Science Product, Inc. USA) を15 μl 、クロラミンT溶液を10 μl 加え反応させた。5 分ごとにクロラミンT溶液10 μl を加え、この操作を2 回繰り返した後15 分後に還元剤として二亜硫酸ナトリウム100 μl 加え、反応を停止させた。次に、Sephadex G-50 (Pharmacia Biotech. Sweden) カラムクロマト上に乗せ、PBS で溶出、標識体を精製した。最後に、非標識-リボソーム複合体を添加して比活性 (4×10^6 Bq/mg protein) を調整して 13 種類の ^{125}I 標識リボソーム液を得た。

【実施例 28】

【0105】

各種の糖鎖結合リボソーム複体のマウスでの腸管から血中への移行量の測定

一昼夜水分以外絶食した雄性ddYマウス (7週齢) に、実施例 27 により ^{125}I 標識された 13 種の糖鎖結合並びにtris(hydroxymethyl)aminomethane結合リボソーム複合体0.2mlを蛋白質量として3 μg /一匹の割合になるように、マウス用経口ゾンデで腸管内に強制投与した後、10分後にネンブータル麻酔下で下大動脈より血液1mlを採血した。そして、血中の ^{125}I 放射能をガンマーカウンター (Alola ARC300) で測定した。さらに、各種のリボソーム複体の生体内安定性を調べる目的で、各血液の血清をSephadex G-50で再クロマトしたが、いずれも大半の放射能が高分子量のボイドフラクションにみられ、各種のリボソーム複合体は生体内においても安定性を有していた。なお、腸管から血中への放射能移行量は、投与全放射能に対する血液1ml当たりの放射能の割合 (%投与量/ml血液) で表示した。この結果を図 27 から図 31 に示す。

【実施例 29】

【0106】

抗癌剤ドキソルビシン封入リボソームの調製

リポソームはコール酸透析法を用いて調製した。すなわち、ジパルミトイルフォスファチジルコリン、コレステロール、ジセチルフォスフェート、ガングリオシド及びジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンをモル比でそれぞれ35:40:5:15:5の割合で合計脂質量45.6mgになるように混合し、コール酸ナトリウム46.9mg添加し、クロロホルム/メタノール溶液3mlに溶解した。この溶液を蒸発させ、沈殿物を真空中で乾燥させることによって脂質膜を得た。得られた脂質膜をTAPS緩衝生理食塩液 (pH8.4) 10mlに懸濁、超音波処理し、透明なミセル懸濁液10mlを得た。このミセル懸濁液にTAPS緩衝液 (pH8.4) で3mg/mlになるよう完全に溶解した抗癌剤ドキソルビシンを攪拌しながらゆっくりと滴下して均一に混合した後、このドキソルビシン入りミセル懸濁液をPM10膜 (Amicon Co., USA) とTAPS緩衝生理食塩液 (pH8.4) を用いた限外濾過にかけ均一な抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子懸濁液10mlを調製した。得られた生理食塩懸濁液中 (37℃) の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置 (Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK) により測定した結果、平均粒子径は50~350nm、平均ゼータ電位は-30~-10mVであった。

【実施例30】

【0107】

抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム脂質膜面上の親水性化処理

実施例29で調製した抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム溶液10mlをXM300膜 (Amicon Co., USA) とCBS緩衝液 (pH 8.5) を用いた限外濾過にかけ溶液のpHを8.5にした。次に、架橋試薬bis(sulfosuccinimidyl)suberate (BS3; Pierce Co., USA) 10mlを加え、25℃で2時間攪拌した。その後、更に7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミンとBS3との化学結合反応を完結した。そして、このリポソーム液をXM300膜とCBS緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過にかけた。次に、CBS緩衝液 (pH 8.5) 1mlに溶かしたtris(hydroxymethyl)aminomethane 40mgをリポソーム液10mlに加えて、25℃で2時間攪拌後、7℃で一晩攪拌してリポソーム膜上の脂質に結合したBS3とtris(hydroxymethyl)aminomethaneとの化学結合反応を完結した。これにより、抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜の脂質ジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン上にtris(hydroxymethyl)aminomethaneの水酸基が配位して水和親水性化された。

【実施例31】

【0108】

抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面上へのヒト血清アルブミン (HSA) の結合

既報の手法 (Yamazaki, N., Kodama, M. and Gabius, H.-J. (1994) Methods Enzymol. 242, 56-65) により、カップリング反応法を用いて行った。すなわち、この反応は2段階化学反応で行い、まずはじめに、実施例2で得られた10mlのリポソーム膜面上に存在するガングリオシドを1mlのTAPS緩衝液 (pH 8.4) に溶かしたメタ過ヨウ素酸ナトリウム43mgを加えて室温で2時間攪拌して過ヨウ素酸酸化した後、XM300膜とPBS緩衝液 (pH 8.0) で限外濾過することにより酸化されたりポソーム10mlを得た。このリポソーム液に、20mgのヒト血清アルブミン (HSA) を加えて25℃で2時間攪拌し、次にPBS (pH 8.0) に2M NaBH₃CN 100 μ lを加えて10℃で一晩攪拌してリポソーム上のガングリオシドとHSAとのカップリング反応でHSAを結合した。そして、XM300膜とCBS緩衝液 (pH 8.5) で限外濾過をした後、HSA結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液10mlを得た。

【実施例32】

【0109】

抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン (HSA) 上へのアルファ1,6マンノビオース二糖鎖の結合とリンカー蛋白質 (HSA) の親水性化処理

アルファ1,6マンノビオース二糖鎖 (Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結してアルファ1,6マンノビオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例31で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pi

erco Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記のアルファ1,6マンノピオース二糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにアルファ1,6マンノピオース二糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図32で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、図4で示されるアルファ1,6マンノピオース二糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理をした抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム(略称: DX-A6) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g)が得られた。得られた生理食塩懸濁液中(37℃)の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置(Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK)により測定した結果、平均粒子径は50~350nm、平均ゼータ電位は-30~-10mVであった。

【実施例33】

【0110】

抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上への3-フコシルラクトース三糖鎖の結合とリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理

3-フコシルラクトース三糖鎖(Calbiochem Co., USA) 50 μ gを0.25gのNH₄HCO₃を溶かした0.5ml水溶液に加え、37℃で3日間攪拌した後、0.45 μ mのフィルターで濾過して糖鎖の還元末端のアミノ化反応を完結して3-フコシルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを得た。次に、実施例31で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液に上記の3-フコシルラクトース三糖鎖のグリコシルアミン化合物50 μ gを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPに3-フコシルラクトース三糖鎖の結合を行った。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan) 13mgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図32で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理をしたリポソームを得た。その結果、図38で示される3-フコシルラクトース三糖鎖とヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理をした抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム(略称: DX-3FL) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g)が得られた。得られた生理食塩懸濁液中(37℃)の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置(Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK)により測定した結果、平均粒子径は50~350nm、平均ゼータ電位は-30~-10mVであった。

【実施例34】

【0111】

抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン(HSA)上へのtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合によるリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理

比較試料としての抗癌剤ドキソルビシン封入リポソームを調製するために、実施例31で得た抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液の一部分1mlに架橋試薬3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl) propionate (DTSSP; Pierce Co., USA) 1mgを加えて25℃で2時間、続

いて7℃で一晩攪拌し、XM300膜とCBS緩衝液(pH 8.5)で限外濾過してDTSSPがリポソーム上のHSAに結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理リポソーム1mlを得た。次に、このリポソーム液にtris(hydroxymethyl)aminomethane(Wako Co., Japan)13mgを加えて、25℃で2時間攪拌し、その後7℃で一晩攪拌し、XM300膜とPBS緩衝液(pH 7.2)で限外濾過してリポソーム膜面結合ヒト血清アルブミン上のDTSSPにtris(hydroxymethyl)aminomethaneの結合を行った。その結果、図32で示されるtris(hydroxymethyl)aminomethaneとヒト血清アルブミンとリポソームとが結合したリンカー蛋白質(HSA)の親水性化処理をした比較試料としての抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム(略称:DX-T R I S) 2ml(総脂質量2mg、総蛋白量200 μ g)が得られた。得られた生理食塩懸濁液中(37℃)の抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム粒子の粒子径とゼータ電位をゼータ電位・粒子径・分子量測定装置(Model Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., UK)により測定した結果、平均粒子径は50~350nm、平均ゼータ電位は-30~-10mVであった。

【実施例35】

【0112】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体の尾静注投与による担癌マウスでの制癌効果の測定
Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞(約 2×10^7 個)を雄性ddY マウス(7週齢)の右大腿部皮下に移植し、癌組織が50~100立方ミリメートルに発育(6~8日後)したものの約40匹を本実験に用いた。この担癌マウス10匹づつを4群に分けてそれぞれの群に、実施例32と実施例34で調製した糖鎖結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または糖鎖なし抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または生理食塩水またはフリーのドキソルビシン液を0.2ml、3~4日置きに4回(癌細胞移植後、7日、11日、14日、18日)、尾静注投与した。腫瘍体積は、移植腫瘍の長径(L)および短径(S)をノギスで測定し、次の式により算出した。腫瘍体積(立方ミリメートル) = $1/2 \times L \times S \times S$ この結果を図39または図40に示す。図に示すように、本発明のリポソームにドキソルビシンを封入したものをを用いた場合に腫瘍の体積の上昇は抑制され、腫瘍抑制効果が認められた。

【実施例36】

【0113】

各種の糖鎖結合リポソーム複合体の経口投与による担癌マウスでの制癌効果の測定
Ehrlich ascites tumor (EAT) 細胞(約 2×10^7 個)を雄性ddY マウス(7週齢)の右大腿部皮下に移植し、癌組織が50~100立方ミリメートルに発育(6~8日後)したものの約30匹を本実験に用いた。この担癌マウス10匹づつを3群に分けてそれぞれの群に、実施例33と実施例34で調製した糖鎖結合抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または糖鎖なし抗癌剤ドキソルビシン封入リポソーム液または生理食塩水を0.6ml、3~4日置きに4回(癌細胞移植後、7日、11日、14日、18日)、経口投与した。腫瘍体積は、移植腫瘍の長径(L)および短径(S)をノギスで測定し、次の式により算出した。腫瘍体積(立方ミリメートル) = $1/2 \times L \times S \times S$ この結果を図41または図42に示す。図に示すように、本発明のリポソームにドキソルビシンを封入したものをを用いた場合に腫瘍の体積の上昇は抑制され、腫瘍抑制効果が認められた。

【産業上の利用可能性】

【0114】

本発明の標的指向性リポソームは、適切な医薬効果を有する化合物を封入することにより、体内でリポソーム表面に結合している糖鎖が認識・結合し得るレクチンを発現している組織・器官に到達し細胞に取り込まれ、そこで医薬効果を有する化合物がその効果を発揮し、治療薬および診断薬として用いることができる。特に抗癌剤を封入し、癌治療薬として用いることができる。また、本発明の腸管吸収制御性リポソームは腸管から容易に吸収され、その後標的指向性リポソームと同様に体内で封入された医薬効果を有する物質がその効果を迅速に発揮し得る。

【図面の簡単な説明】

【0115】

【図1】 アルファ1,2マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模

式図である。

【図2】 アルファ1,3マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図3】 アルファ1,4マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図4】 アルファ1,6マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図5】 アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図6】 オリゴマンノース3五糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図7】 オリゴマンノース4六糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図8】 オリゴマンノース5七糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図9】 オリゴマンノース6八糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図10】 オリゴマンノース7九糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図11】 オリゴマンノース8十糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図12】 オリゴマンノース9十一糖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図13】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の血中への分布量を示す図である。

【図14】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肝臓への分布量を示す図である。

【図15】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の脾臓への分布量を示す図である。

【図16】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の肺への分布量を示す図である。

【図17】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の脳への分布量を示す図である。

【図18】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の癌組織への分布量を示す図である。

【図19】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後のリンパ節への分布量を示す図である。

【図20】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の胸腺への分布量を示す図である。

【図21】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の心臓への分布量を示す図である。

【図22】 13種のリポソーム複合体の静脈内投与60分後の小腸への分布量を示す図である。

【図23】 3'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図24】 6'-シアリルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図25】 3'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図26】 6'-シアリルラクトサミン三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模

式図である。

【図 2 7】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 2 8】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 2 9】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 3 0】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 3 1】4種のリポソーム複合体の腸管内投与10分後の血中への移行量を示す図である。

【図 3 2】比較試料としてのtris(hydroxymethyl)aminomethaneを結合したリポソームの模式図である。

【図 3 3】ルイスX型三糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図 3 4】シアリルルイスX型四糖鎖を結合したリポソームの構造例を示す模式図である。

【図 3 5】ラクトース二糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図 3 6】2'-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図 3 7】ジフコシルラクトース四糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

【図 3 8】3-フコシルラクトース三糖鎖により修飾されたリポソームの構造例を示す模式図である。

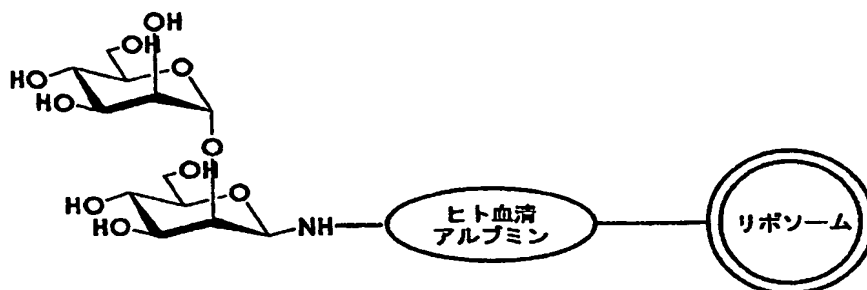
【図 3 9】アルファ1,6マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

【図 4 0】アルファ1,6マンノビオース二糖鎖を結合したリポソームの尾静注投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

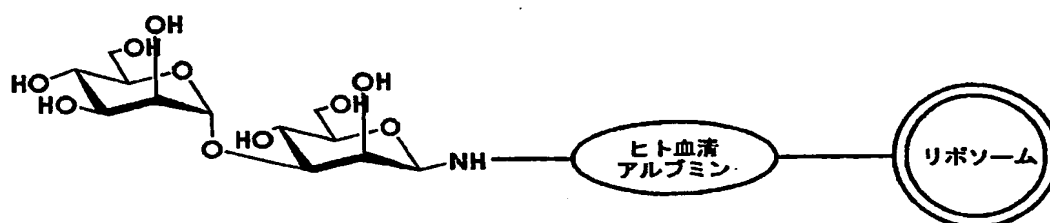
【図 4 1】3-フコシルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの経口投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

【図 4 2】3-フコシルラクトース三糖鎖を結合したリポソームの経口投与での担癌マウスにおける制癌効果を示す図である。

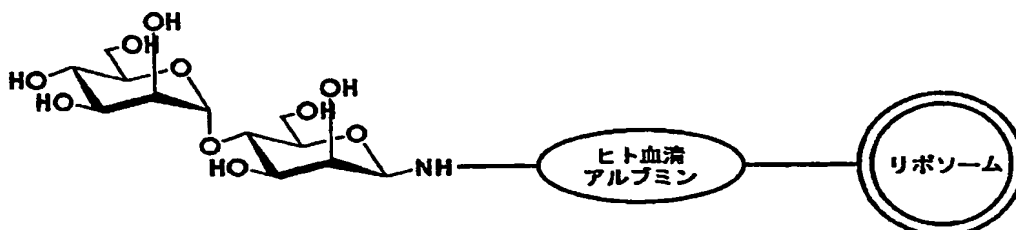
【書類名】図面
【図 1】



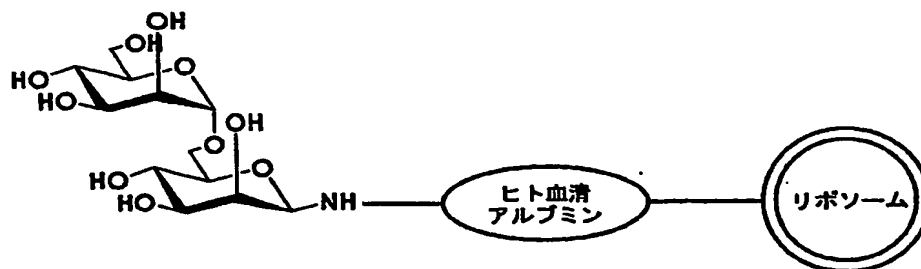
【図 2】



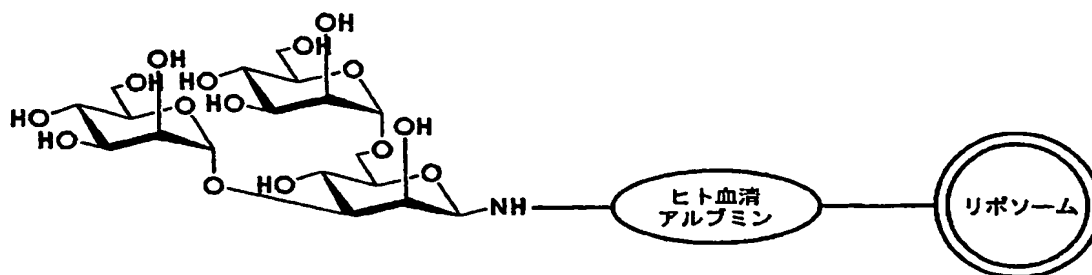
【図 3】



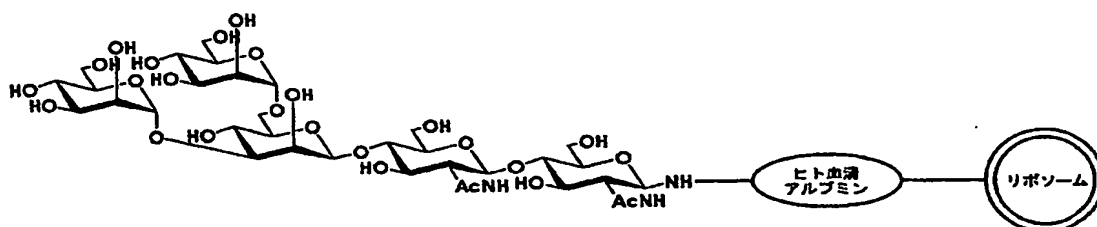
【図 4】



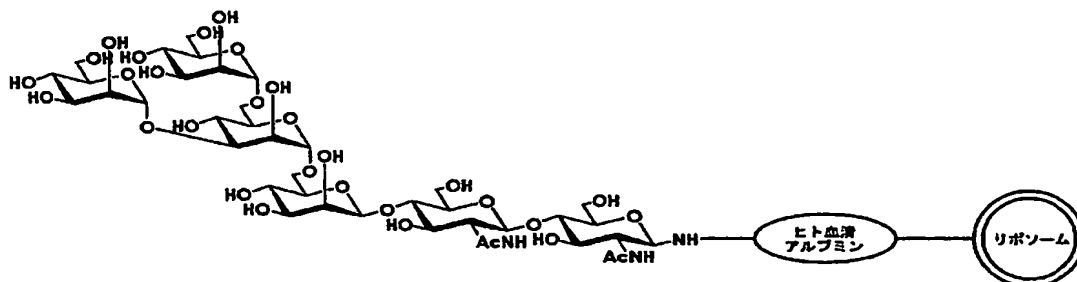
【図5】



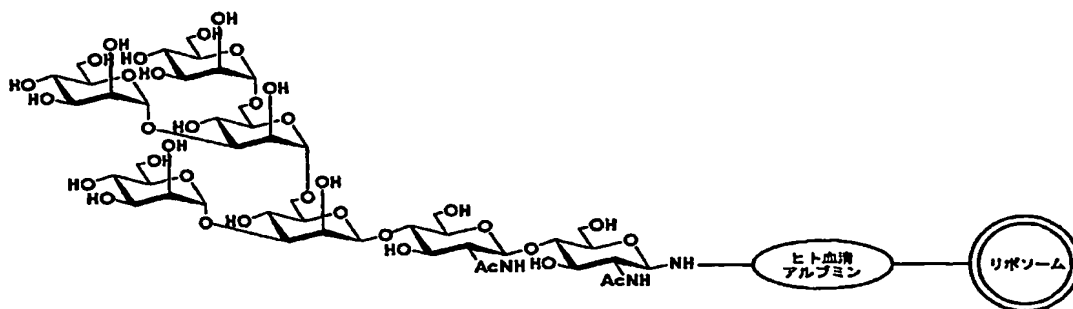
【図6】



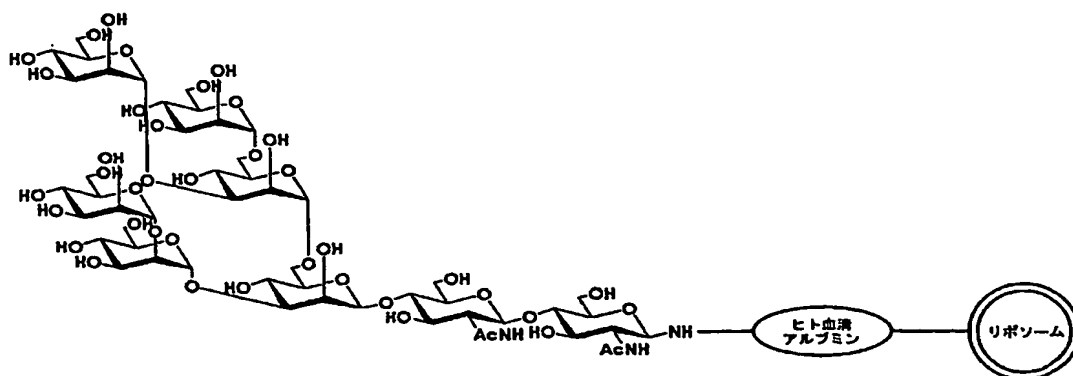
【図7】



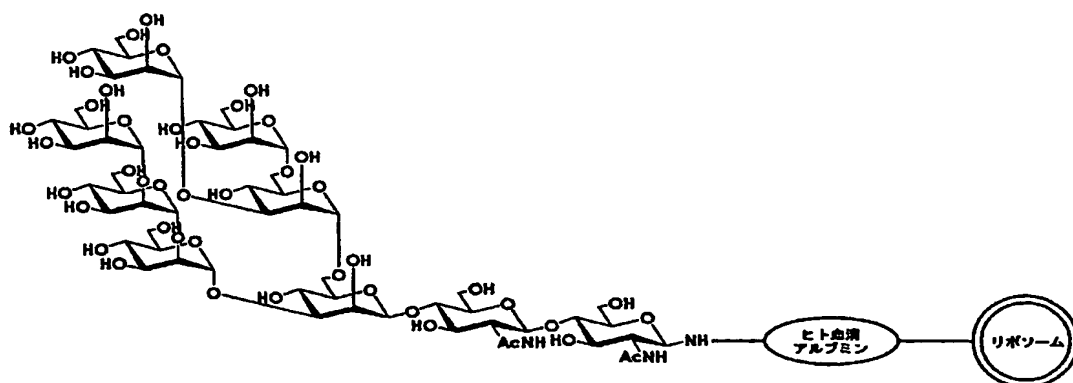
【図8】



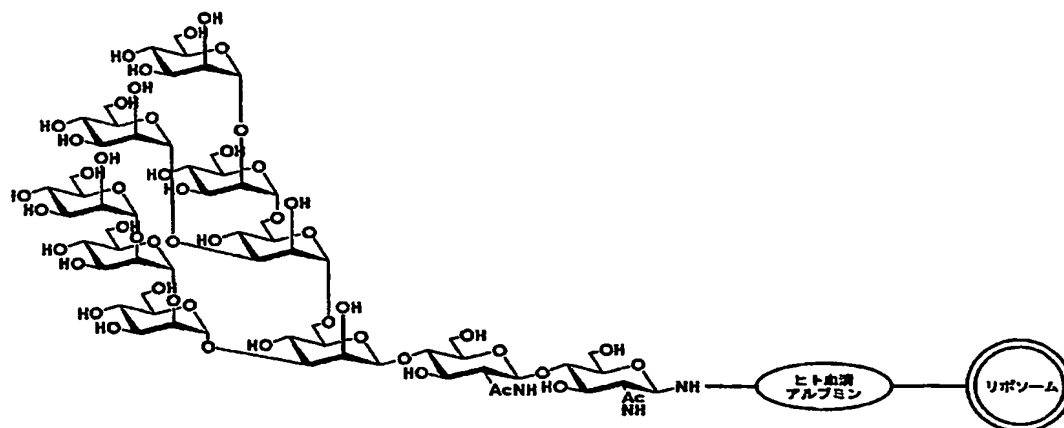
【図9】



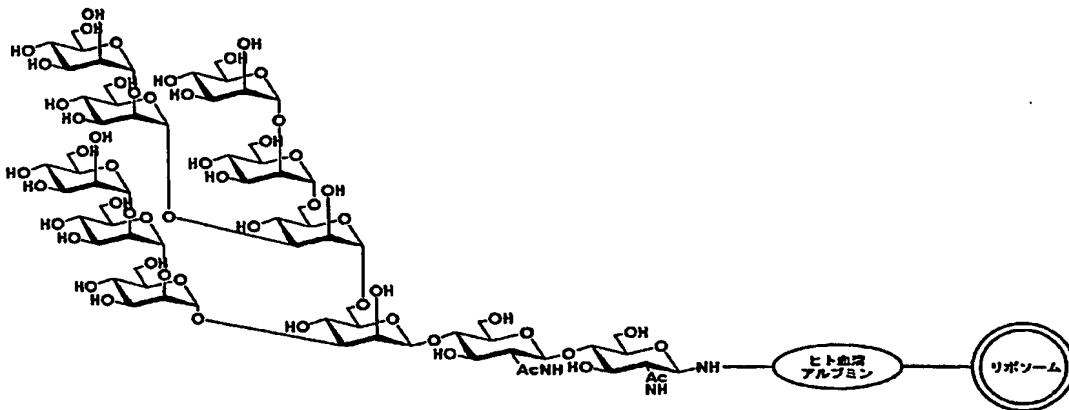
【図10】



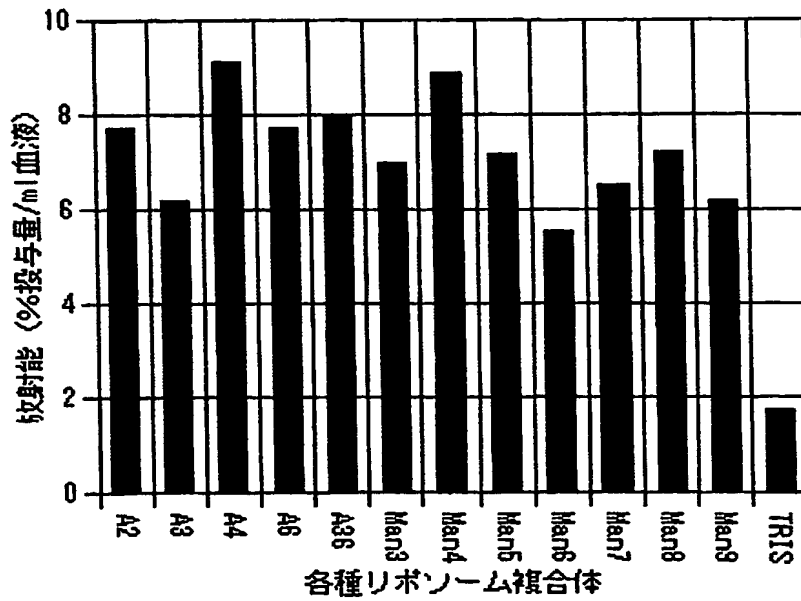
【図11】



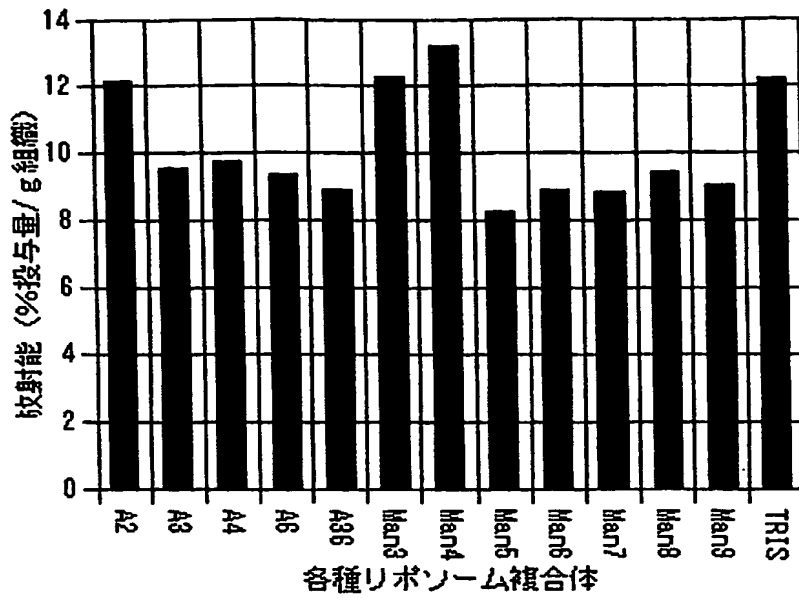
【図12】



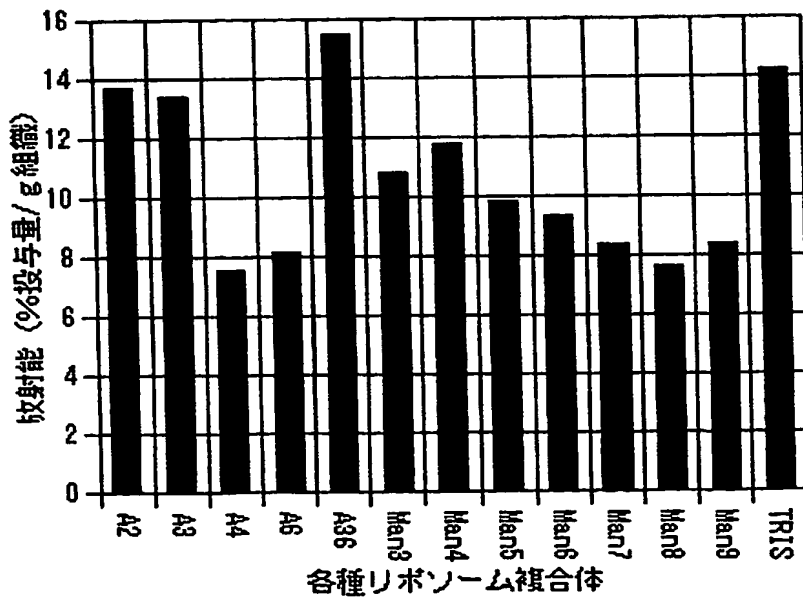
【図13】



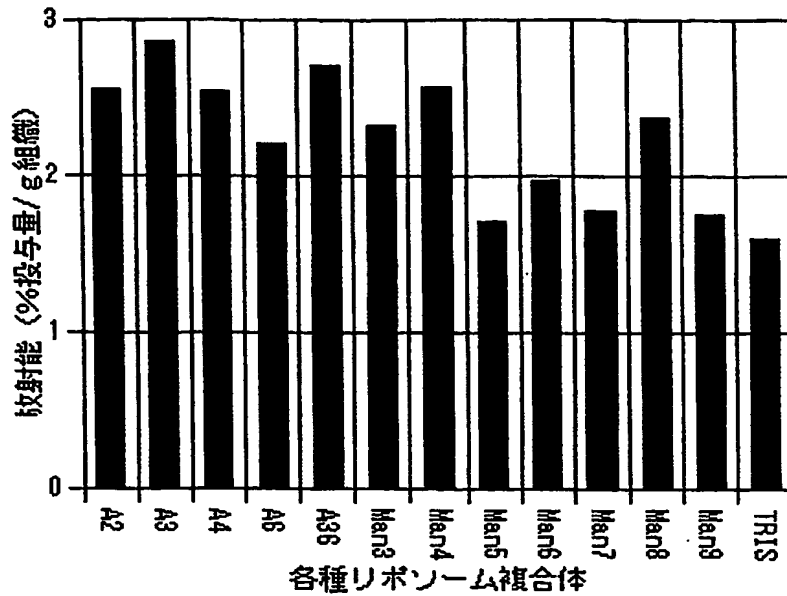
【図14】



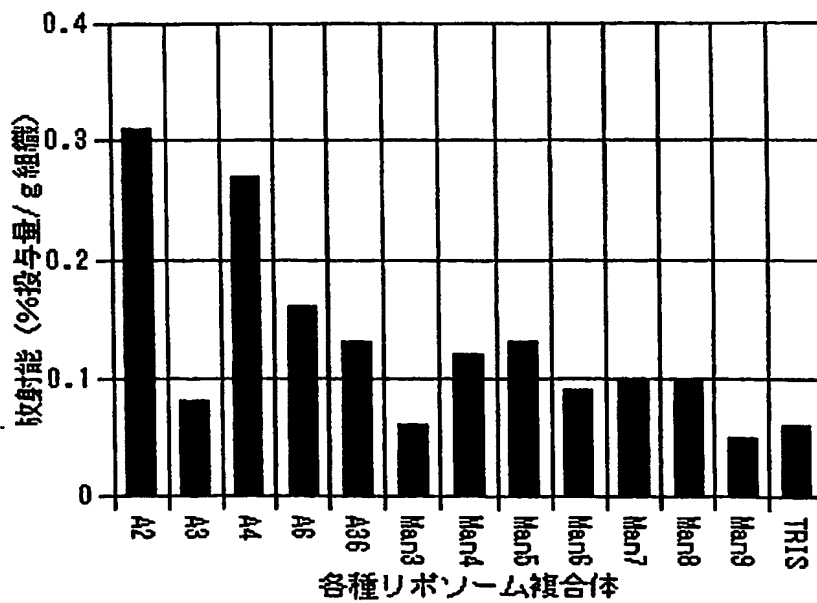
【図15】



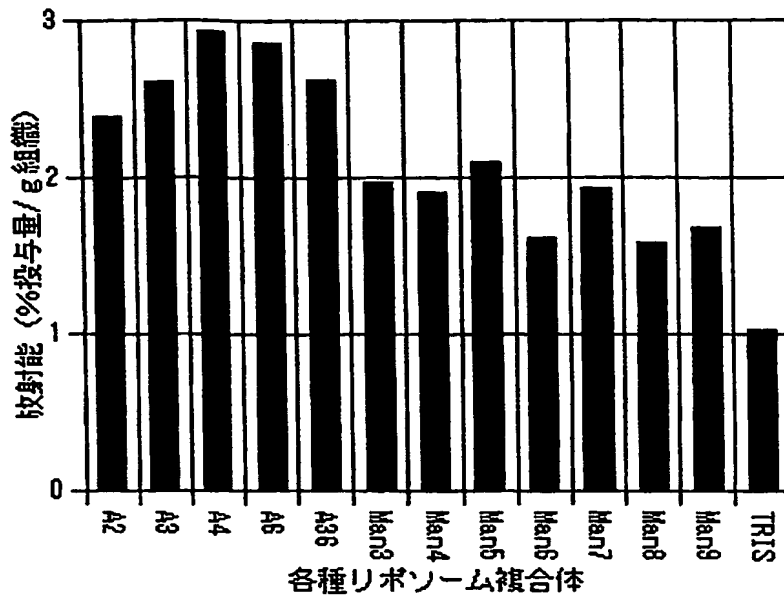
【図 16】



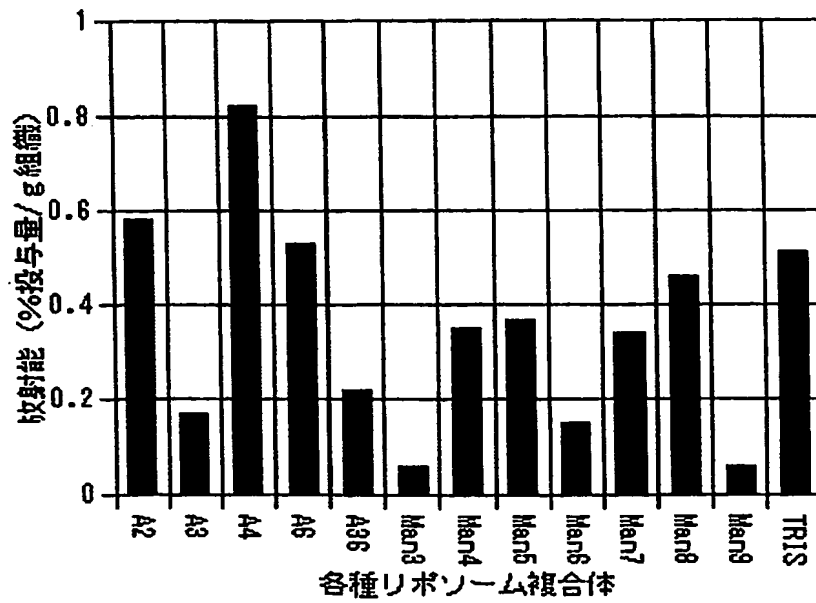
【図 17】



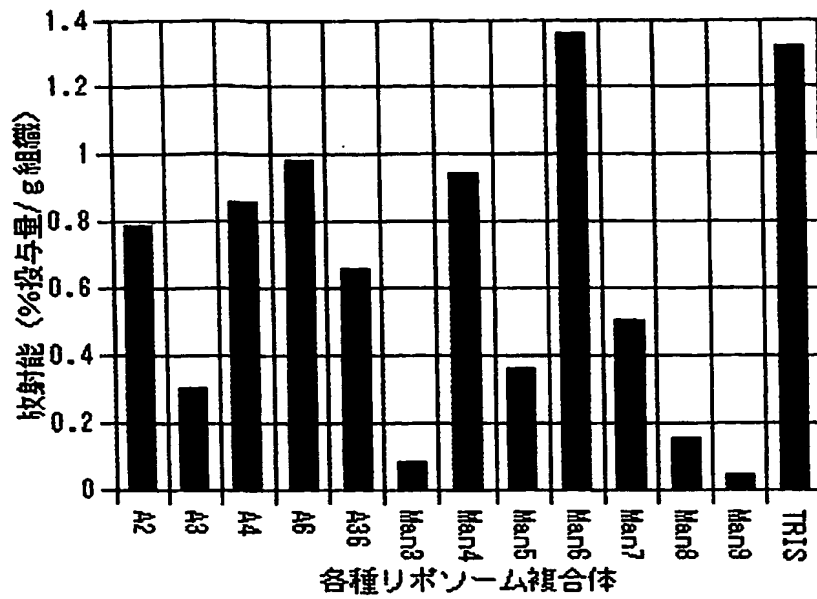
【図18】



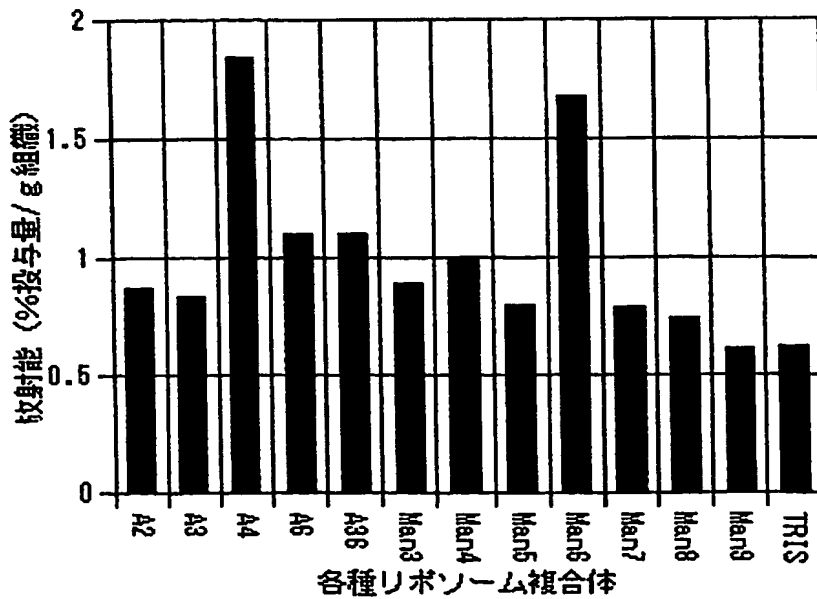
【図19】



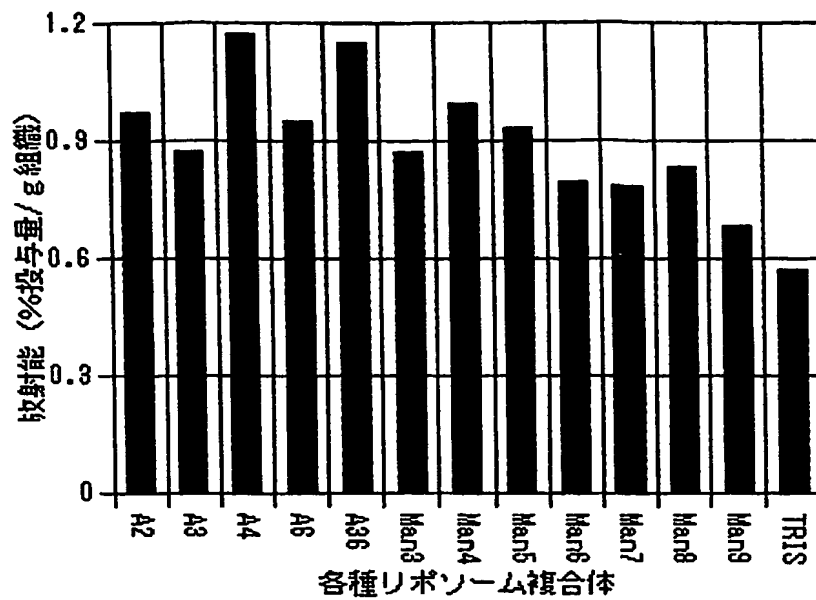
【図20】



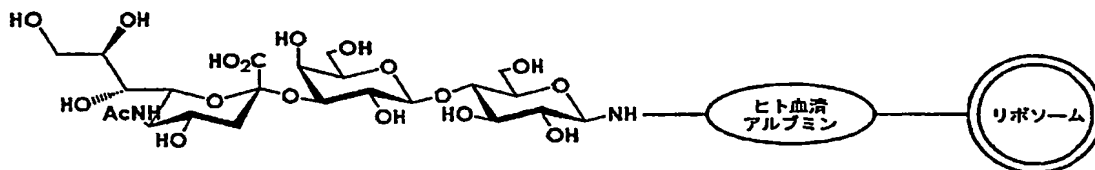
【図21】



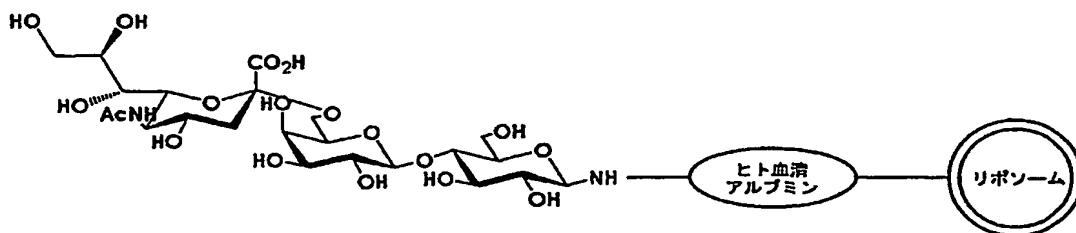
【図 2 2】



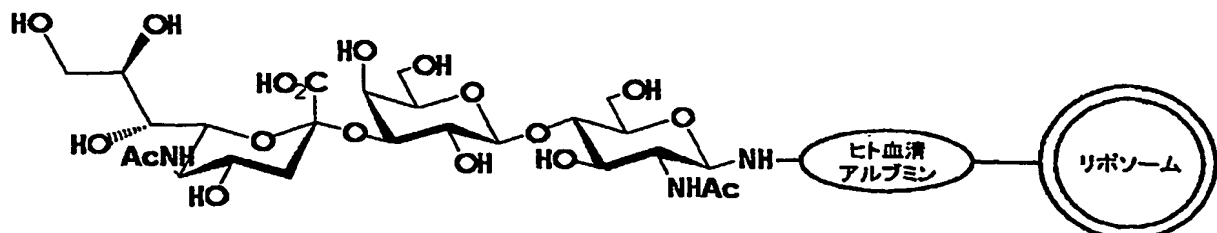
【図 2 3】



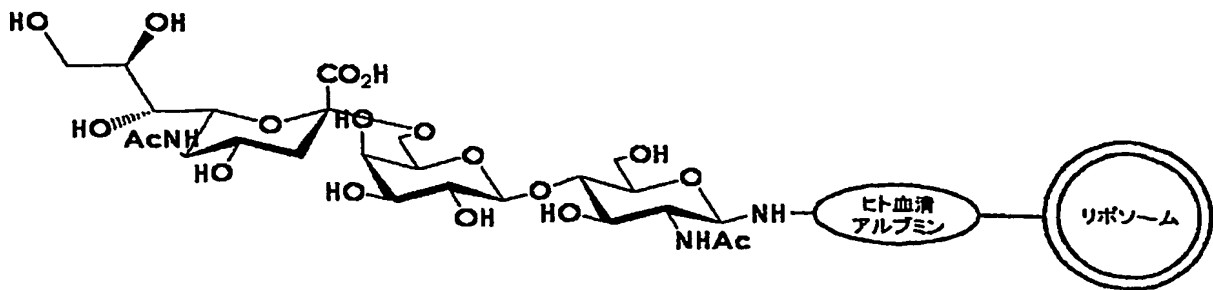
【図 2 4】



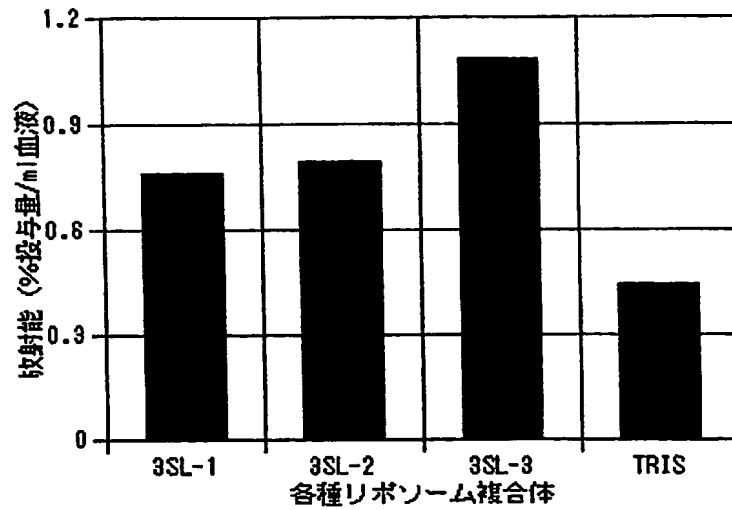
【図 2 5】



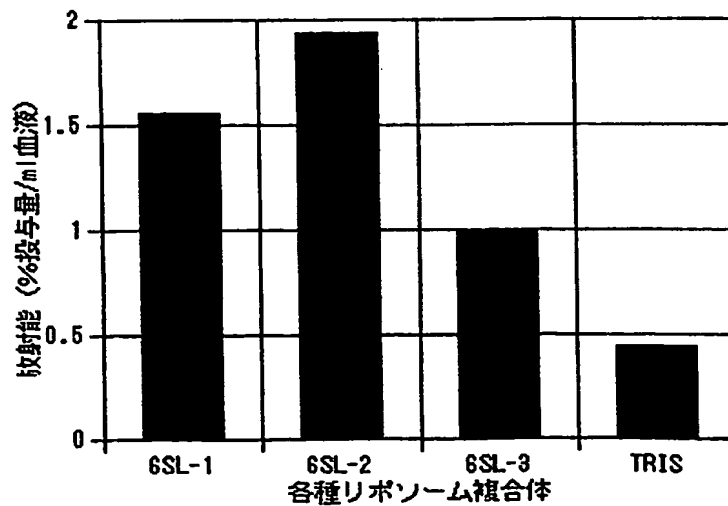
【図26】



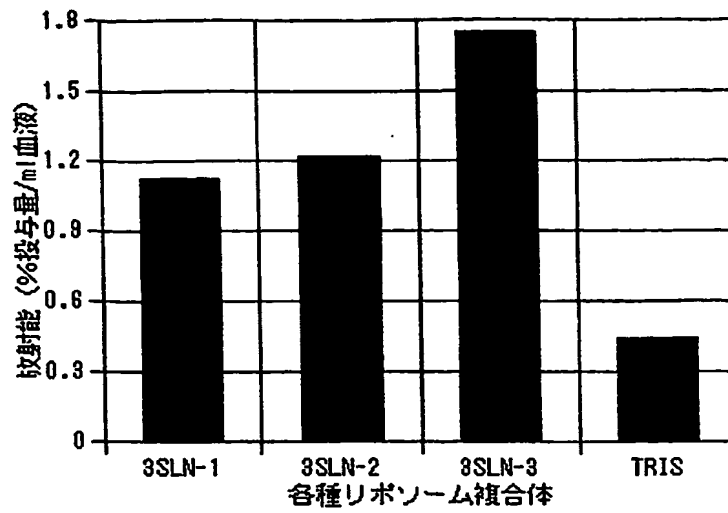
【図27】



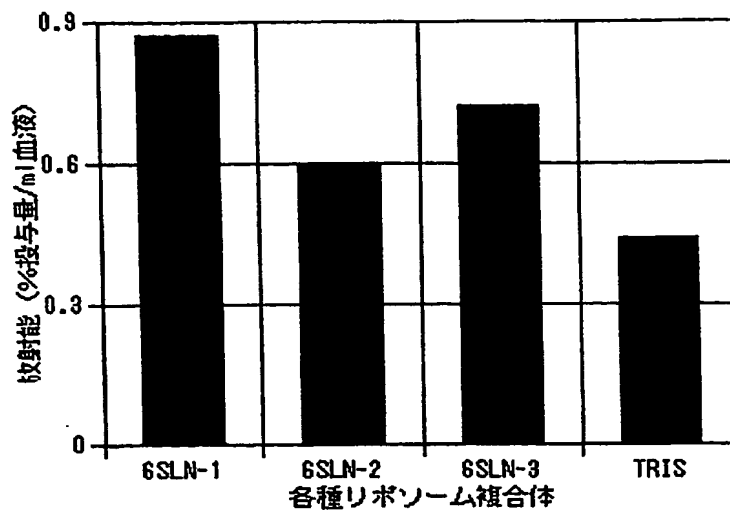
【図28】



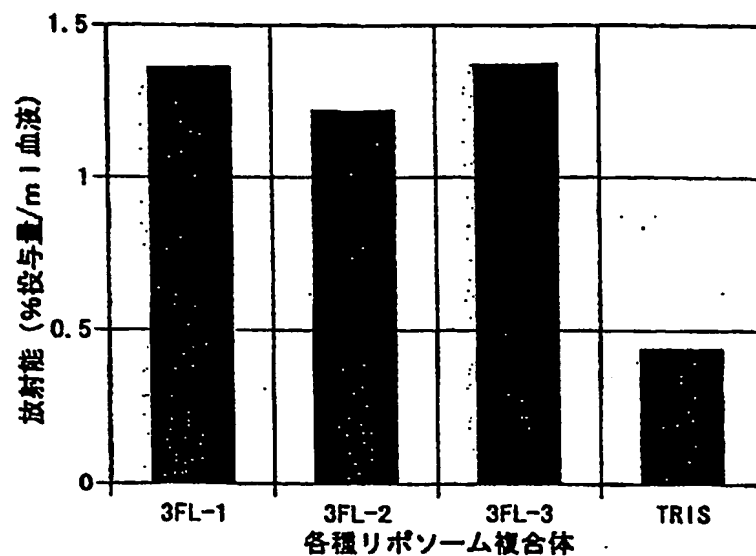
【図 29】



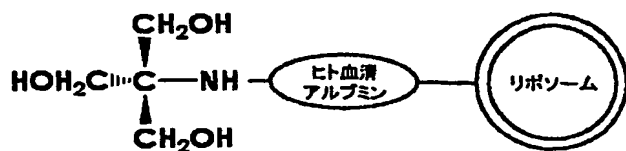
【図 30】



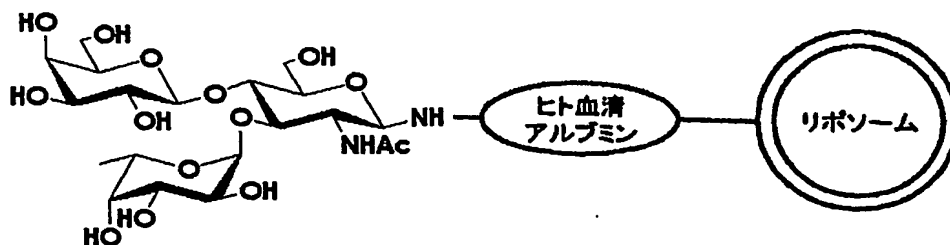
【図 3 1】



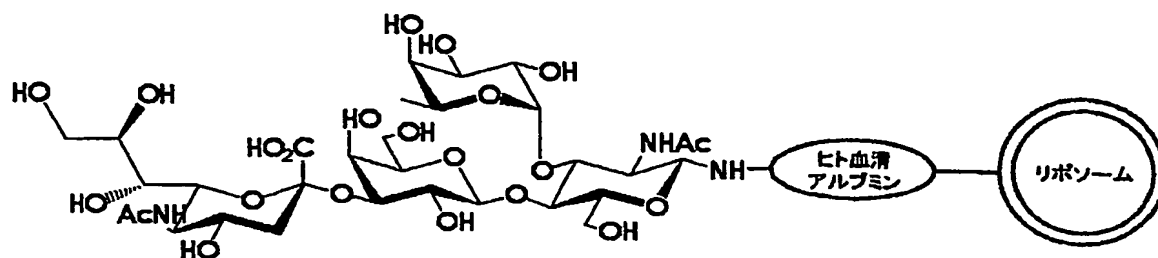
【図 3 2】



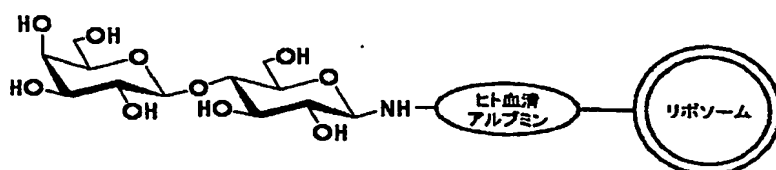
【図 3 3】



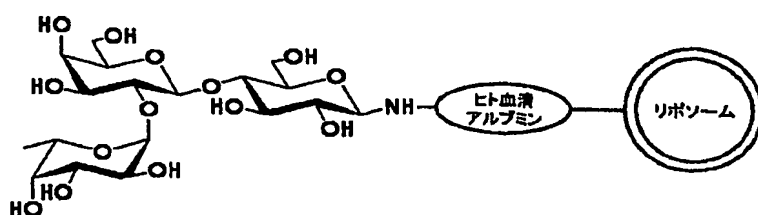
【図 34】



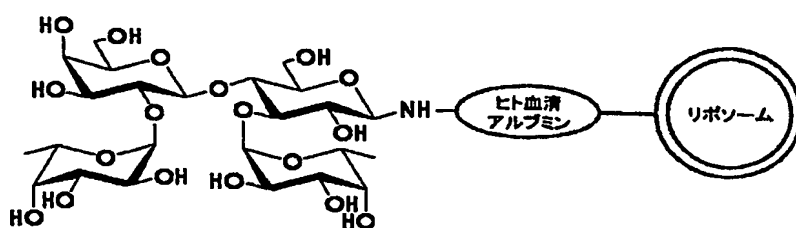
【図 35】



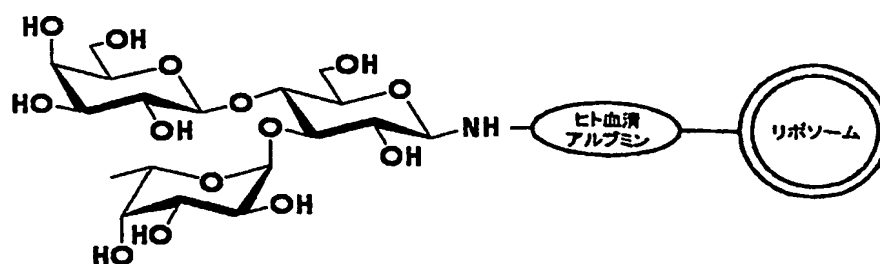
【図 36】



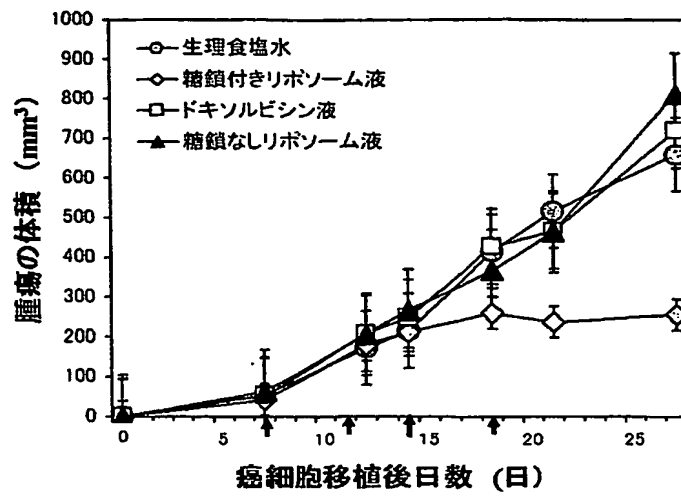
【図 37】



【図 38】

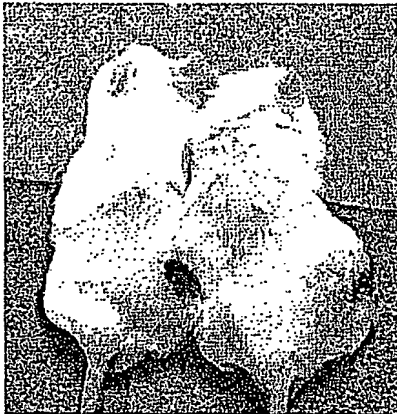


【図 39】

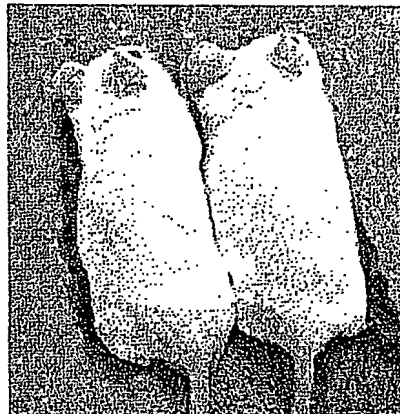


【図 40】

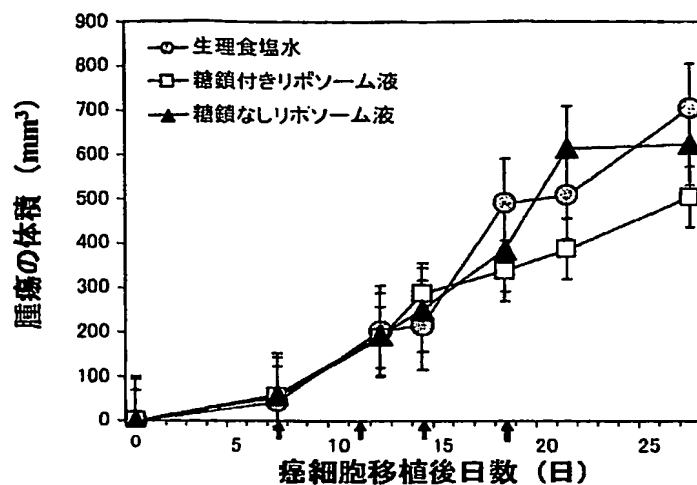
生理食塩水投与群



糖鎖付きリポソーム投与群

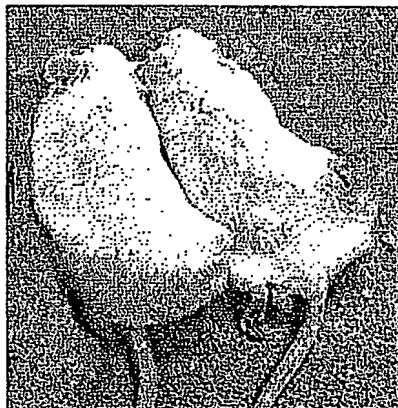


【図 4 1】

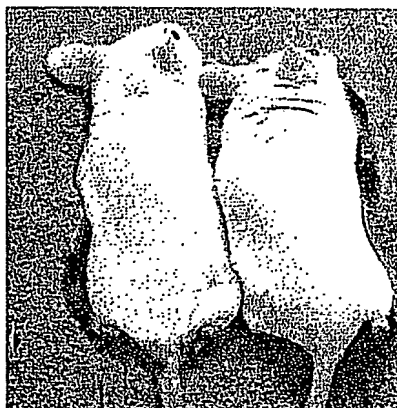


【図 4 2】

生理食塩水投与群



糖鎖付きリボソーム投与群



【書類名】 要約書**【要約】**

【課題】 各種組織の細胞表面上に存在する各種のレクチン（糖鎖認識蛋白質）に対して特異的な結合活性を有する糖鎖を結合したリボソームであって、実際の生体内の細胞、組織を識別して薬剤あるいは遺伝子を効率的に輸送し得るリボソームを提供することを目的とする。

【解決手段】 糖鎖がリボソーム膜に結合されているものであって、糖鎖が、アルファ1,2マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3マンノピオース二糖鎖、アルファ1,4マンノピオース二糖鎖、アルファ1,6マンノピオース二糖鎖、アルファ1,3アルファ1,6マンノトリオース三糖鎖、オリゴマンノース3五糖鎖、オリゴマンノース4b六糖鎖、オリゴマンノース5七糖鎖、オリゴマンノース6八糖鎖、オリゴマンノース7九糖鎖、オリゴマンノース8十糖鎖、オリゴマンノース9十一糖鎖、3'-シアリルラクトース三糖鎖、6'-シアリルラクトース三糖鎖、3'-シアリルラクトサミン三糖鎖、6'-シアリルラクトサミン三糖鎖、ルイスX型三糖鎖、シアリルルイスX型四糖鎖、ラクトース二糖鎖、2'-フコシルラクトース三糖鎖、ジフコシルラクトース四糖鎖および3-フコシルラクトース三糖鎖からなる群から選ばれたものであることを特徴とする糖鎖修飾リボソーム。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2004-093872
受付番号	50400510705
書類名	特許願
担当官	楠本 眞 2169
作成日	平成 16 年 5 月 27 日

< 認定情報・付加情報 >

【特許出願人】

【識別番号】	301021533
【住所又は居所】	東京都千代田区霞が関 1-3-1
【氏名又は名称】	独立行政法人産業技術総合研究所

【代理人】

申請人

【識別番号】	100091096
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門 1 丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】	100118773
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門 1 丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	藤田 節

【選任した代理人】

【識別番号】	100111741
【住所又は居所】	東京都港区虎ノ門 1 丁目 17 番 1 号 虎ノ門 5 森ビル 3 階 平木国際特許事務所
【氏名又は名称】	田中 夏夫

特願 2004-093872

出願人履歴情報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日

2001年 4月 2日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区霞が関1-3-1

氏 名

独立行政法人産業技術総合研究所